



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PŘÍDAVEK PROBIOTICKÉ SLOŽKY DO VÝROBKŮ PRO DĚTSKOU VÝŽIVU

ADDITION OF PROBIOTICS TO BABY FOOD PRODUCTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Markéta Dudrová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1544/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií
Studentka: **Bc. Markéta Dudrová**
Studijní program: Chemie a technologie potravin
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie
Vedoucí práce: **prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.**

Název diplomové práce:

Přídavek probiotické složky do výrobků pro dětskou výživu

Zadání diplomové práce:

1. Rešerše – probiotické bakterie a účinky, dětské výrobky obohacené o probiotika
2. Optimalizace kultivace, zpracování a stabilizace probiotik
3. Analýza probiotik ve vybraných výrobcích pro dětskou výživu
4. Vyhodnocení a diskuse výsledků

Termín odevzdání diplomové práce: 6.8.2021:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Markéta Dudrová
student(ka)

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá přípravou probiotických kultur *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* a *Bifidobacterium breve* obohacených o vhodná prebiotika určených k aplikaci do výrobků pro dětskou výživu. Jako prebiotika byly vybrány přírodní extrakty z matchy, moringy, mladé pšenice, mladého ječmene, chlorelly a spiruliny.

Teoretická část je zaměřena na probiotické bakterie, jejich biologické účinky a jejich současný vliv na dětský organismus. Experimentální část se zabývá kultivací probiotických bakterií s rostlinnými extrakty, sledováním jejich viability a následnou stabilizací do enkapsulované formy. Pro zvýšení stability byly směsi probiotických buněk s prebiotiky enkapsulovány do alginátových částic. Část alginátových částic byla ještě sušena mrazem metodou lyofilizace. Směsi probiotických kultur s rostlinnými extrakty v neenkapsulované, enkapsulované a lyofilizované formě byly působením modelových trávicích šťáv podrobeny simulaci lidského trávení. Vybrané extrakty rostlinných materiálů byly charakterizovány z hlediska celkového obsahu sacharidů, redukujících sacharidů, celkových fenolických látek, jednotlivých fenolických látek a antioxidační aktivity.

Pro porovnání byly vybrány dva dětské komerční doplňky stravy s obsahem probiotik, které byly charakterizovány z hlediska počtu buněk a jejich životaschopnosti. Probiotické přípravky byly také podrobeny modelovému trávení.

KLÍČOVÁ SLOVA

Dětská výživa, prebiotika, probiotika, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium breve*, enkapsulace, alginátové částice, lyofilizace, modelové trávení, průtoková cytometrie.

ABSTRACT

This Diploma thesis deals with preparation of probiotic cultures *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium breve* enriched with prebiotics meant for application in baby food products. Natural extracts from matcha, moringa, young beat, young barley, chlorella and spirulina were selected as prebiotics.

The theoretical part is focused on probiotic bacteria, their biological effects and their effects on the child's body. The experimental part deals with the cultivation of probiotic bacteria with plant extracts, monitoring their viability and stabilization in an encapsulated form. Mixtures of probiotic cells with prebiotics were encapsulated into alginate particles to increase stability. Some of the alginate particles were processed by freeze drying. Mixtures of probiotic cultures with plant extracts were subjected to model human digestion by the action of model digestive juices in unencapsulated, encapsulated and lyophilized form. Selected extracts of plant materials were characterized in terms of amount of total and reducing sugars, total phenolic substances, individual phenolic substances and antioxidant activity.

Further, two baby commercial dietary supplements containing probiotics were selected, which were characterized in terms of cell number and viability. Probiotic products were also subjected to model digestion.

KEYWORDS

Food for infants, prebiotics, probiotics, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium breve*, encapsulation, alginate particles, lyophilization, digestion model, flow cytometry.

DUDROVÁ, M. *Přídavek probiotické složky do výrobků pro dětskou výživu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2021. 87 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studentky

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí své diplomové práce prof. RNDr. Ivaně Márové, CSc. za trpělivost a odborné vedení. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Julii Hoové za cenné rady, ochotu a pomoc při zpracování experimentální části. Velké díky patří také rodině a přátelům, kteří mne po celou dobu studia podporovali.

OBSAH

1	Úvod.....	10
2	Teoretická část.....	11
2.1	Probiotika.....	11
2.1.1	Střevní mikroflóra.....	13
2.1.1.1	Střevní mikroflóra u dětí.....	13
2.1.2	Mechanismus působení probiotik.....	14
2.1.3	Charakteristika vybraných rodů probiotických mikroorganismů.....	14
2.1.3.1	Rod <i>Lactobacillus</i>	15
2.1.3.2	Rod <i>Bifidobacterium</i>	15
2.1.4	Vedlejší účinky a možná rizika spojená s konzumací probiotik.....	16
2.1.5	Potraviny s probiotickou složkou.....	16
2.2	Prebiotika.....	17
2.2.1	Mechanismus působení.....	17
2.2.2	Rostlinné materiály s potencionálním prebiotickým účinkem.....	18
2.2.2.1	Matcha.....	18
2.2.2.2	Moringa.....	18
2.2.2.3	Mladá pšenice.....	19
2.2.2.4	Mladý ječmen.....	20
2.2.2.5	Chlorella.....	20
2.2.2.6	Spirulina.....	21
2.3	Synbiotika.....	21
2.4	Dětská výživa.....	21
2.4.1	Dětské výrobky obohacené o probiotika a prebiotika.....	22
2.5	Význam probiotik v prevenci a léčbě dětských nemocí.....	22
2.5.1	Průjemová onemocnění spojená s užíváním antibiotik.....	22
2.5.2	Alergická onemocnění.....	23
2.5.3	Intolerance laktózy.....	23
2.5.4	Nádorová onemocnění.....	23
2.5.5	Nespecifické střevní záněty.....	23
2.6	Enkapsulace.....	23
2.6.1	Materiály pro enkapsulaci.....	24
2.6.2	Alginát.....	24
3	Cíl práce.....	25
4	Experimentální část.....	26
4.1	Použité chemikálie.....	26

4.2	Použité přístroje a pomůcky.....	27
4.3	Použité probiotické kultury.....	28
4.4	Použité probiotické doplňky stravy pro děti.....	28
4.4.1	LAKTOBACÍLKY BABY sáčky.....	29
4.4.2	OSMOBIOTIC FLORA BABY kapky.....	29
4.5	Použité prebiotické produkty.....	29
4.6	Příprava extraktů.....	30
4.7	Charakterizace extraktů.....	30
4.7.1	Stanovení sacharidů.....	31
4.7.1.1	Stanovení celkových sacharidů metodou dle Duboise.....	31
4.7.1.2	Stanovení redukujících sacharidů metodou dle Somogyi-Nelsona.....	31
4.7.1.3	Příprava roztoků pro stanovení redukujících sacharidů dle Somogyi-Nelsona	32
4.7.2	Stanovení celkových fenolických látek.....	32
4.7.3	Stanovení jednotlivých fenolických látek pomocí HPLC s UV-VIS detekcí.....	32
4.7.4	Stanovení antioxidační aktivity.....	33
4.8	Kultivace probiotických bakterií v tekutém médiu.....	34
4.9	Stanovení viability a počtu buněk probiotických bakterií.....	34
4.9.1	Spektrofotometrické stanovení zákalu.....	34
4.9.2	Průtokový cytometr.....	35
4.10	Vliv rostlinných materiálů na viabilitu bakterií.....	35
4.11	Promytí buněk.....	35
4.12	Příprava alginátových částic.....	35
4.13	Příprava lyofilizovaných alginátových částic.....	36
4.14	Charakterizace alginátových částic.....	36
4.14.1	Stanovení enkapsulační účinnosti.....	36
4.15	Modelové trávení.....	37
4.15.1	Příprava modelových trávicích šťáv.....	37
4.15.1.1	Žaludeční šťáva.....	37
4.15.1.2	Pankreatická šťáva.....	37
4.15.1.3	Žlučová šťáva.....	37
4.15.2	Stanovení viability probiotických buněk s prebiotickými produkty v různých formách	37
4.15.2.1	Modelové trávení směsí probiotických buněk s rostlinnými extrakty.....	37
4.15.2.2	Modelové trávení směsí probiotických buněk s reálnými práškovými vzorky	38

4.15.3	Stanovení stability částic s enkapsulovanými probiotickými bakteriemi a prebiotiky	39
4.15.3.1	Modelové trávení alginátových částic	39
4.15.3.2	Modelové trávení lyofilizovaných alginátových částic	39
4.15.4	Modelové trávení vybraných komerčních probiotických preparátů	39
5	Výsledky a diskuze	40
5.1	Charakterizace extraktů	40
5.1.1	Stanovení celkových sacharidů metodou dle Duboise	40
5.1.2	Stanovení redukujících sacharidů metodou dle Somogyi-Nelsona	41
5.1.3	Stanovení celkových fenolických látek	42
5.1.4	Stanovení fenolických látek pomocí HPLC	42
5.1.5	Stanovení antioxidační aktivity	45
5.2	Vliv rostlinných materiálů na viabilitu bakterií	46
5.2.1	Interakce prebiotik s <i>Lactobacillus acidophilus</i>	47
5.2.2	Interakce prebiotik s <i>Lactobacillus casei</i>	48
5.2.3	Interakce prebiotik s <i>Bifidobacterium breve</i>	49
5.2.4	Vliv koncentrační řady chlorelly a spiruliny na viabilitu bakterií	50
5.3	Modelové trávení směsí probiotických buněk s rostlinnými extrakty	53
5.3.1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	53
5.3.2	<i>Lactobacillus casei</i>	55
5.3.3	<i>Bifidobacterium breve</i>	57
5.4	Modelové trávení směsí probiotických buněk s reálnými práškovými vzorky	58
5.5	Antioxidační aktivita směsí probiotických buněk s rostlinnými extrakty po trávení	60
5.6	Výběr vhodných kombinací probiotik a prebiotik pro přípravu alginátových částic	61
5.7	Charakterizace alginátových částic	63
5.7.1	Stanovení enkapsulační účinnosti	64
5.7.2	Stabilita připravených částic	64
5.7.2.1	Modelové trávení alginátových částic	64
5.7.2.2	Modelové trávení lyofilizovaných alginátových částic	67
5.8	Charakterizace komerčních probiotických doplňků stravy	70
5.8.1	Kontrola deklarovaného množství buněk v komerčních doplňcích stravy	70
5.8.2	Modelové trávení vybraných komerčních probiotických preparátů	71
5.9	Shrnutí a výběr nejlepších probiotických a prebiotických složek	74
6	Závěr	76
7	Seznam použitých zdrojů	79
8	Seznam použitých zkratk a symbolů	83
9	Příloha	84

9.1	Příloha 1: Kalibrační křivky fenolických látek získaných z HPLC s UV-VIS detekcí.....	84
9.2	Příloha 2: Chromatogram extraktu zeleného ječmene – stanovení fenolických látek pomocí HPLC s UV/VIS detekcí.....	85
9.3	Příloha 3: Záznam z průtokového cytometru.....	86
9.4	Příloha 4: Záznam alginátových částic z optického mikroskopu.....	87

1 ÚVOD

Střevní mikroflóra je důležitou součástí střevní ochranné bariéry a v dětském věku hraje významnou roli. Složení střevní mikroflóry je velmi variabilní a liší se mezi jedinci jedné věkové skupiny. Kvalitativní změny v jejím složení ovlivňují imunitní systém hostitele. Snaha ovlivnit mikrobiální prostředí ve střevě je proto důležitou součástí vývoje funkčních potravin a potravinových doplňků. V rámci definice funkčních potravin existuje podskupina potravin, která je považována za zdraví prospěšnou. Jedná se o potraviny, které jsou vyráběny živými mikroorganismy nebo živé mikroorganismy přímo obsahují. Tyto potraviny se nazývají probiotika.

Náš životní styl je silně ovlivněn stravou, kterou mohou být uvedeny do chodu epigenetické procesy. Náchylnost k alergiím, kardiovaskulárním onemocněním a mnoha dalším onemocněním, má svůj počátek již v matčině těle. Výživa je proto považována za jeden z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících fyziologické procesy ve zdraví a nemoci. Jsou hledány nutričně hodnotné potraviny, které by pozitivně působily na zdraví konzumenta nebo snižovaly riziko vzniku onemocnění. To splňují funkční potraviny obsahující probiotika, prebiotika nebo synbiotika, které v sobě skrývají nepochybný pozitivní potenciál využitelný zejména u jedinců v dětském věku.

Mikroflóra se podílí na využití energie z nestrávených sacharidů procházejících horní částí trávicího traktu a na ochraně proti invazivním střevním patogenům. Pochopení významu střevní mikroflóry pro zdraví vede v poslední době ke snaze přiblížit u nekojených dětí složení střevní mikroflóry co nejvíce kojeným dětem, a to přidáním prebiotik a probiotik do stravy.

Cílem práce je vývoj a příprava kombinovaných probiotických a prebiotických preparátů obsahujících vhodné kmeny mléčných bakterií a probiotik ve stabilizované formě včetně ověření jejich viability, stability během modelového trávení a dalších biologických účinků.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Probiotika

Termín probiotikum je relativně nové slovo, které bylo odvozeno z řeckého jazyka a znamená „pro život“. V současné době se využívá k pojmenování bakterií spojených s příznivými účinky na člověka a zvířata [1; 2].

Definice probiotik byla nejprve velmi úzká a vztahovala se výhradně na zvířata. V průběhu času však podléhala historickému vývoji. S příchodem nových vědeckých poznatků ze studia metabolismu bakterií a dalších experimentů poukazujících na roli, kterou hrají mikroorganismy v lidském zdraví, bylo potřeba stávající definici rozšířit [2; 3]. Podle Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) a Světové zdravotnické organizace (WHO) jsou probiotika označována jako živé mikroorganismy, které při podávání v přiměřeném množství pozitivně ovlivňují zdravotní stav hostitele [1]. Probiotika jsou tedy směsné kultury nebo monokultury živých mikroorganismů, které po aplikaci prospěšně ovlivňují zdraví hostitele tím, že upravují složení jeho střevní mikrobioty [4].

Jednotlivé bakteriální kmeny mohou být zařazeny mezi probiotika, jestliže splňují příslušná bezpečnostní a funkční kritéria související s jejich technologickou užitečností. Nejdůležitější požadavky pro výběr probiotických kmenů jsou uvedeny v Tabulce 1. Bezpečnost bakteriálního kmene je definována jeho původem a rezistencí na antibiotika. Funkční aspekty definují jejich přežití v gastrointestinálním traktu. Probiotické kmeny musí dále splňovat požadavky spojené s technologií jejich výroby. To znamená, že musí být schopné zachovávat si svoji životaschopnost i během skladování a distribuce. Zjednodušeně řečeno, bakteriální kmeny musí být zdraví prospěšné, netoxické, nepatogenní a rezistentní při průchodu trávicím traktem [4; 5; 6].

Tabulka 1: Nejdůležitější požadavky na probiotika [5]

Kritérium	Požadované vlastnosti
Bezpečnost	<ul style="list-style-type: none"> • Lidský nebo zvířecí původ • Přesná diagnostická identifikace • Izolace z gastrointestinálního traktu zdravých jedinců • Absence genů odpovědných za rezistenci vůči antibiotikům • Žádné nežádoucí účinky
Funkce	<ul style="list-style-type: none"> • Konkurenceschopnost ve střevním ekosystému • Antagonistický vliv vůči patogenům • Schopnost přežít, růst a být metabolicky aktivní v trávicím ústrojí příjemce • Odolnost vůči enzymům i žaludečním a žlučovým kyselinám • Schopnost adherence a kolonizace
Technologická použitelnost	<ul style="list-style-type: none"> • Snadná produkce vysokého množství biomasy a vysoká produktivita • Stabilita během výroby, skladování a distribuce • Genetická stabilita • Odolnost vůči bakteriofágům

Mezi probiotické mikroorganismy patří laktobacily, bifidobakterie, streptokoky, enterokoky, enterobakterie i nebakteriální organismy, jako je nepatogenní kvasinka rodu *Saccharomyces*. Přehled kmenů nejčastěji využívaných probiotických mikroorganismů je uveden v Tabulce 2. Nejvíce používanými probiotiky jsou kmeny z rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* [4; 7].

Tabulka 2: Nejčastěji používané probiotické kmeny [4; 7]

Laktobacily	Bifidobakterie	Ostatní druhy
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	Grampozitivní koky
<i>L. brevis</i>	<i>B. animals</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pedicoccus pentosaceus</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
<i>L. delbrückii</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>L. gallinarum</i>		<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>L. gasseri</i>		
<i>L. fermentum</i>		Enterobakterie
<i>L. paracasei</i>		<i>E. coli</i>
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. reuteri</i>		Kvasinky
<i>L. rhamnosus</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>

Probiotický přípravek musí ve své denní dávce obsahovat určité minimální množství CFU (CFU – Colony Forming Units, angl.), tedy jednotek tvořících kolonie. Aby se u člověka projevil příznivý účinek na zdraví, měla by denní dávka probiotického produktu činit 10^6 až 10^9 CFU. Toto množství je považováno za minimální účinnou dávku pro terapeutické účely [7].

2.1.1 Střevní mikroflóra

Střevní mikroflóra tvoří velmi důležitou část gastrointestinálního traktu, který je kolonizován různými druhy mikroorganismů specifickými pro každého jedince. Největší množství bakterií, a to více než 99 %, žije v tlustém střevě. Tlusté střevo je osídleno 10^{12} CFU/g. Střevní mikrobiota člověka se skládá z více než 500 bakteriálních druhů a několika tisíc bakteriálních kmenů, což představuje komplexní a velmi rozmanitý ekosystém. Je tvořena převážně zástupci kmenů *Bacteroidetes* (rod *Bacteroides*) a *Firmicutes* zahrnující například rod *Lactobacillus*, *Clostridium* a *Enterococcus*. Podstatně menší zastoupení mají kmeny *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Verucomicrobia*, *Cyanobacteria* [7; 8; 9].

Střevní mikroflóra hraje zásadní roli při zachování našeho zdraví. Tento střevní mikrobiální ekosystém slouží jako ochranná bariéra proti patogenům, zajišťuje stimulaci imunitního systému, vytváří produkty mikroflóry (kyselinu mléčnou, propionovou, octovou i máselnou) a syntetizuje některé vitamíny. Pro správnou funkci střevní mikroflóry musí být její bakteriální složení v kvantitativní rovnováze [8].

2.1.1.1 Střevní mikroflóra u dětí

Před narozením dítěte je gastrointestinální trakt plodu sterilní. K prvnímu osídlení dochází ale už při porodu dítěte, kdy je zahájena kolonizace prostřednictvím laktobacilů a bifidobakterií nacházejících se v porodních cestách. V trávicím traktu musí mikroorganismy nejprve překonat kyselé pH žaludku a poté se za žaludkem usídlují a vytváří střevní mikroflóru. V případě, že dítě přišlo na svět císařským řezem, nedošlo ke kontaktu s mikroorganismy a střevní kolonizace je opožděna zhruba o 10 dní. Střevní trakt těchto dětí je osídlován bakteriemi (stafylokoky, klostridiemi, *E. coli*) z okolního prostředí. Již po jednom měsíci života je jejich střevní mikroflóra srovnatelná s mikroflórou dětí narozených vaginální cestou. [10; 11].

Složení střevní mikroflóry je dále ovlivňováno způsobem výživy dítěte (kojení, umělá výživa). Optimální výživou je kojení, a to jak z hlediska nutričních potřeb, tak i rozvoje imunitní reaktivity. Mateřské mléko umožňuje optimální kolonizaci GIT pomocí menšího

množství širokého spektra nepatogenních bakterií, jako jsou *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* a *Bifidobacterium*. Kojené děti proto již během prvního týdne života vykazují vyšší počty bakterií než děti nekojené. Převládajícími bakteriemi ve střevech kojených dětí jsou bakterie kmene *Bifidobacterium* [7; 12]. Naproti tomu nekojený novorozenec živený umělou výživou má střevní mikroflóru pestřejší a komplexnější. Tvoří ji klostridia, bifidobakterie, enterobakterie, laktobacily, *E. coli*, streptokoky a bakteroidy [7; 10].

Po ukončení kojení a po přechodu na smíšenou stravu je střevní mikroflóra ve dvou letech dítěte velmi podobná mikroflóře dospělého člověka. To je způsobeno zvýšením počtu klostridií, bakteroidů a anaerobních streptokoků [7; 10]. K nesprávnému složení střevní mikroflóry však dochází u dětí, které se narodily císařským řezem nebo kojeny vůbec nebyly. To může způsobovat problémy s imunitou, které se projeví častou nemocností. V tomto momentě přichází na řadu uměle podávaná probiotika, která umožňují vytvoření rovnováhy ve střevech a tím posílení imunitního systému [12].

2.1.2 Mechanismus působení probiotik

Mechanismus účinku spočívá v tom, že probiotika produkují různé substance jako například organické kyseliny, peroxid vodíku a bakteriociny. Tyto látky následně působí inhibičně na grampozitivní a gramnegativní bakterie, čímž snižují nejen počet živých buněk, ale ovlivňují metabolismus bakterií a produkci toxinů. Další mechanismus je založený na adhezaci. Část probiotických kmenů má mimořádnou schopnost adherovat na střevní epitel, a proto kompetitivní inhibicí blokují adhezní místa pro potenciálně patogenní bakterie. Probiotika využívají také nutriety, které by v opačném případě byly spotřebovány patogenními mikroorganismy [10]. Tento mechanismus má důležitý efekt na zdraví hostitele. Adheze probiotických mikroorganismů k epiteliálním buňkám může navíc vyvolat signální kaskádu vedoucí k imunologické modulaci. Případné uvolnění některých rozpustných komponent může způsobit přímou nebo nepřímou aktivaci imunologických buněk. Tento účinek hraje důležitou roli v prevenci a léčbě nakažlivých chorob, jakož i chronického zánětu zažívacího traktu nebo jeho částí [5]. Některá probiotika mají schopnost inhibovat produkci bakteriálních toxinů. Existuje také možná role probiotik při eliminaci rakovinotvorných buněk [5; 10].

2.1.3 Charakteristika vybraných rodů probiotických mikroorganismů

Z probiotických kultur jsou nejčastěji využívány bakteriální kmeny rodu *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* [7].

2.1.3.1 Rod *Lactobacillus*

Jedná se o nesporeující grampozitivní tyčinky. Jsou mikroaerofilní nebo fakultativně anaerobní. Většina druhů je schopna růst kolem 45 °C. Označují se za bakterie mléčného kvašení, jelikož zkvašují glukózu a laktózu na kyselinu mléčnou. Vedle této kyseliny, která je hlavním metabolickým produktem, mohou produkovat ještě značné množství kyseliny octové, jantarové, ethanolu a CO₂. Podle produktů katabolického metabolismu rozdělujeme rod *Lactobacillus* na homofermentativní mléčné bakterie, kam patří druhy *L. acidophilus*, *L. delbruckii*, *L. plantarum* a na heterofermentativní obsahující například *L. casei*, *L. fermentum* a *L. brevis* [13]. Struktura kmene *Lactobacillus acidophilus* je zobrazena na Obrázku 1.

Z potravinářského a biotechnologického hlediska tvoří nejdůležitější rod, který je hojně rozšířen v přírodě a na zkvasitelném materiálu. Jeho druhy můžeme nalézt v mléce, v půdě, na obilí, travinách i jiných rostlinách. Dále také v ústech a trávicím traktu lidí nebo zvířat [13].



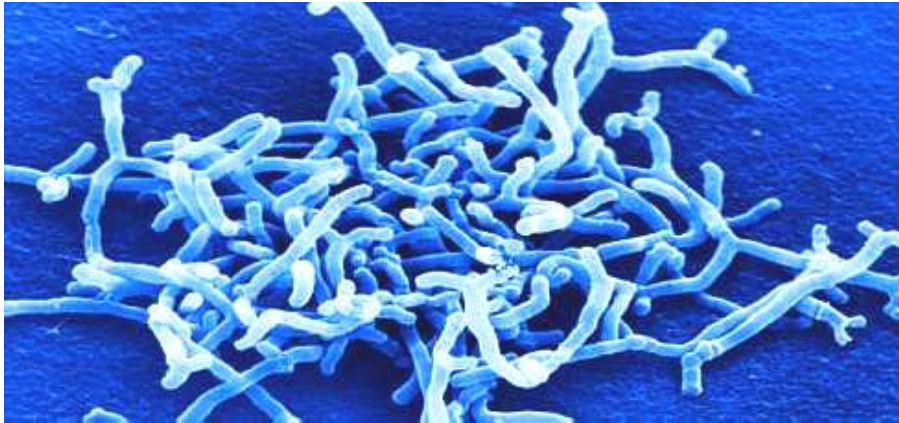
Obrázek 1: *Lactobacillus acidophilus*

2.1.3.2 Rod *Bifidobacterium*

Mikroorganismy rodu *Bifidobacterium* jsou anaerobní, nesporeující, grampozitivní tyčinky. Mají velmi nepravidelný kokovitý nebo kyjovitý tvar až po dlouhé větvené tyčinky. Některé druhy jsou přirozenou součástí trávicího traktu dospělých jedinců, kojenců i zvířat. Své uplatnění našly v potravinářském průmyslu při přípravě mléčných nápojů s blahodárnými dietetickými účinky [13].

Tento rod je charakteristický tvorbou acetátu a laktátu ze sacharidů, kdy dochází k současné produkci malého množství ethanolu, mravenčanu a sukcinátu. Do tohoto rodu se

řadí kmeny *Bifidobacterium breve* (Obrázek 2), *Bifidobacterium longum* a *Bifidobacterium thermophilum* [7; 13].



Obrázek 2: *Bifidobacterium breve*

2.1.4 Vedlejší účinky a možná rizika spojená s konzumací probiotik

Běžně používaná probiotika jsou považována za bezpečná, jelikož musí splňovat přísná kritéria. Ve většině případů se jedná o nepatogenní komenzální mikroorganismy. Podávání prebiotik však může být doprovázeno vedlejšími účinky, jako je nadýmání a flatulence [4].

Jelikož je všeobecně známo, že probiotika podporují zdraví a obnovují přirozenou rovnováhu, mnozí se mylně domnívají, že s konzumací probiotik nejsou spojena žádná rizika. Je potřeba si uvědomit, že probiotika s sebou nesou určité riziko, mezi které patří: 1) Alergie na kvasinky; 2) Potenciální interakce s léky na předpis; 3) Souběžné užívání bakteriálních probiotik s antibiotiky nebo souběžné používání kvasinkových probiotik s antimykotiky, což vede ke snížení účinnosti probiotik; 4) Riziko vzniku fungémie, bakteriémie, meningitidy nebo patogenní kolonizace u jedinců se sníženou imunitou; 5) Možné zvýšení počtu kmenů rezistentních na antibiotika [14].

2.1.5 Potraviny s probiotickou složkou

Probiotické mikroorganismy můžeme nalézt jak ve formě doplňků stravy, tak jako přirozené složky potravin. V potravinářském průmyslu jsou tyto bakterie mléčného kvašení využívány ve velkém množství. Část z nich slouží jako startovací kultura v procesu řízeného kvašení například při výrobě sýru nebo piva. Probiotika lze získávat také z potravin, jako jsou jogurty, kefíry a jiné fermentované mléčné výrobky, nakládaná zelenina nebo kysané zelí [3; 15].

2.2 Prebiotika

Prebiotika jsou definována jako nestravitelné složky potravin, které selektivně podporují růst nebo aktivitu jedné bakterie nebo omezeného počtu střevních bakterií. Tato definice se víceméně překrývá s definicí vlákniny, s výjimkou její selektivity pro určité druhy. Tato selektivita byla prokázána u bifidobakterií, které mohou být podporovány požitím látek, jako jsou fruktooligosacharidy a inulin, transgalaktozylované oligosacharidy a sójové oligosacharidy [4; 16].

Koncept prebiotik má v podstatě stejný cíl jako mají probiotika, a to zlepšit zdraví hostitele modulací střevní mikroflóry pomocí jiného mechanismu [1]. Stejně jako v případě probiotik, i prebiotika musí splňovat určitá kritéria, aby mohla být za prebiotika vůbec označována. Prebiotické substance musí být látky rezistentní vůči žaludečním kyselinám a vůči hydrolytickým enzymům v trávicím traktu. Naopak musí být fermentovatelné střevními bakteriemi a dále musí selektivně stimulovat růst nebo aktivitu střevních bakterií, které mají příznivý vliv na prospívání a zdravotní stav hostitele [17]. Prebiotikum musí být schopné odolat podmínkám zpracování potravin a zůstat nezměněné, nedegradované nebo chemicky nezměněné a dostupné pro metabolismus střevních bakterií [5].

Jako prebiotika slouží například ovoce (banány), zelenina (rajčata, artyčoky, cibule, česnek), obiloviny (zelený ječmen, pšenice) a další jedlé rostliny, které jsou zdrojem sacharidů. Prebiotika jsou vyráběna i uměle, příkladem jsou galaktooligosacharidy, fruktooligosacharidy, cyklodextriny a laktulóza. Nejpoužívanějšími a nejúčinnějšími prebiotiky ve vztahu k mnoha druhům probiotik jsou fruktany, jako je inulin a oligofruktóza [5].

2.2.1 Mechanismus působení

Prebiotika jsou obsažena v přírodních produktech, ale mohou být také přidávána do potravin. Účelem těchto přísad je zlepšení jejich nutriční a zdravotní hodnoty. Tyto látky slouží jako médium pro probiotika, kdy stimulují jejich růst a neobsahují žádné mikroorganismy. Prebiotika nejsou trávena hostitelskými enzymy a do tlustého střeva se dostávají prakticky beze změny, kde jsou fermentovány sacharolytickými bakteriemi, například rodem *Bifidobacterium*. Konečnými produkty metabolismu sacharidů jsou převážně mastné kyseliny s krátkým řetězcem (kyselina octová, máselná a propionová), které následně hostitel využívá jako zdroj energie. Spotřeba prebiotik do značné míry ovlivňuje složení střevní mikrobioty a také její metabolickou aktivitu [5]. Konečným efektem je potlačení růstu škodlivých

mikroorganismů a stimulace vlastní přirozené mikroflóry pozitivně ovlivňující nutriční stav a obranyschopnost organismu [8].

2.2.2 Rostlinné materiály s potencionálním prebiotickým účinkem

2.2.2.1 Matcha

Matcha je jemný prášek japonského zeleného čaje (*Camellia sinensis*), který se připravuje mletím čajových lístků. Je pěstována ve stínu, což zvyšuje syntézu biologicky aktivních sloučenin, včetně theaninu, kofeinu, chlorofylu a různých typů katechinů. Zelený čaj obsahuje čtyři hlavní katechiny: epikatechin, epikatechin-3-galát, epigalokatechin a epigalokatechin-3-galát, který vyniká svými protirakovinnými účinky. Matcha má ve srovnání s jinými čaji dostupnými na trhu výjimečně vysoký obsah rutinu, kofeinu i zdraví prospěšných látek, neboť jsou konzumovány celé lístky [18; 19; 20]. Podrobnou analýzou byly v čaji detekovány i další fenolické sloučeniny jako kyselina gallová, kyselina p-hydroxybenzoová, kyselina chlorogenová, kyselina kávová a kyselina ferulová. Její prospěšné vlastnosti jsou přičítány vysokému obsahu antioxidantů a protizánětlivých látek [18]. Díky konzumaci celých čajových lístků je matcha velmi účinná při detoxikaci organismu a také při posílení imunitního systému [20].

2.2.2.2 Moringa

Jedná se o strom pocházející z Indie, který se postupně rozšířil do mnoha zemí tropických a subtropických oblastí, například do Střední a Jižní Ameriky, Afriky a jihovýchodní Asie. Nejznámějším druhem moringy je moringa olejodárná (*Moringa oleifera*), která je zobrazena na Obrázku 3. Moringa je nenáročná rostlina. Je odolná vůči nemocem a škůdcům, a dobře snáší dlouhá období sucha. Každá část tohoto stromu (listy, květy, kůra, kořeny, pryskyřice, semena) je pro nás užitečná a má i léčivé účinky. Moringa je však pěstována zejména pro své listy, lusky a jejich jádra, která slouží k extrakci oleje a k čištění vody. Prášek z jader lusků je schopen na sebe navázat prachové částice ve vodě, které následně klesají ke dnu. Některé studie dokonce uvádí, že tímto způsobem lze z vody odstranit 95 až 99 % bakterií [21; 22].

Listy jsou bohatým zdrojem vitamínu A, B₁, B₂, B₅, C, D i E a také minerálů jako hořčíku, draslíku, železa, manganu, vápníku a fosforu. Dále obsahují vysoké množství chlorofylu, bílkovin a polyfenolů. Moringa obsahuje mnohé fenolické sloučeniny jako rutin, kyselinu gallovou, kyselinu chlorogenovou a kvercetin, které působí rovněž jako antioxidanty [21; 23]. Listy moringy se často suší a drtí na jemný prášek. Tento prášek obsahuje 25x více železa než špenát, 17x více vápníku než mléko, 15x více draslíku než banány a 7x více vitamínu C než

pomeranče. Jak již bylo zmíněno, moringa má významné léčivé účinky. Využívá se například při bolestech hlavy, očních infekcích, horečkách, zánětech, žaludečních křečích nebo pro stabilizaci vysokého krevního tlaku [21; 22].



Obrázek 3: *Moringa olejodárná* [23]

2.2.2.3 Mladá pšenice

Jedná se o výhonky pšeničné rostliny *Triticum aestivum*, které se také označují jako pšeničná tráva (Obrázek 4). Semena pšenice klíčí 6 až 10 dnů. Během této doby dochází k výrazným změnám nutričního profilu v různých fázích růstu trav. V procesu klíčení dochází k syntéze důležitých sloučenin, jako jsou vitamíny a fenoly [24; 25]. Narostlá mladá tráva pšenice se poté odšťavňuje nebo suší na prášek pro lidskou i zvířecí spotřebu [25]. Mladá pšenice obsahuje směs enzymů, vitamínů, antioxidantů a minerálních látek, díky kterým má pozitivní vliv na lidský organismus [22]. Pšenice je tedy bohatým zdrojem snadno vstřebatelných živin v ideálních vzájemných poměrech, a navíc má prokazatelné antioxidační a antimutagenní vlastnosti. Pšeničné výhonky obsahují velké množství látek s protirakovinným účinkem, pomáhají detoxikovat karcinogeny z těla, mají pozitivní vliv na imunitu a díky antioxidačnímu působení pomáhají chránit DNA buněk před poničením volnými radikály. Díky obsahu zeleného barviva chlorofylu, který je svojí strukturou velmi podobný hemoglobinu, má mladá pšenice pozitivní vliv na krevtvorbu a schopnost krve přenášet kyslík [26]. V porovnání s jinými zelenými potravinami jsou právě pšenici přičítány nejrozsáhlejší příznivé účinky na celý gastrointestinální trakt, což znamená, že působí příznivě při průjmu i zácpě [22]. Pšenice je bohatá na vitamín C, E a β -karoten. Z fenolických látek obsahuje kyselinu ferulovou, vanilovou, sinapovou, kávovou a kumarovou [25].



Obrázek 4: Mladá pšenice [24]

2.2.2.4 Mladý ječmen

Ječmen (*Hordeum vulgare L.*) je považován za čtvrtou nejdůležitější plodinu na světě. Zelené listy ječmene jsou nejlepší funkční potravinou, která poskytuje výživu a zároveň eliminuje toxiny z buněk v lidském organismu [27]. Mladý ječmen se z hlediska zastoupení jednotlivých živin velmi podobá výhonkům pšenice, které jsou popsány v kapitole 2.2.2.3. Liší se však množstvím některých látek. V zelených listech ječmene můžeme najít větší množství minerálů, a to 37x více vápníku, 25x více draslíku, 5x více železa, 2x více hořčíku a fosforu [26]. Z vitamínů obsahuje vitamín C, E, β -karoten a komplex vitamínů B [22]. Mladý ječmen je také bohatý na fenolické látky i flavonoidy, a to především na saponarin a kyselinu ferulovou. Ječmen je dále dobrým zdrojem funkčních složek, jako jsou alkaloidy, polysacharidy, tryptofan, kyselina gama-aminomáselná nebo chlorofyl [27]. Díky obsahu chlorofylu a železa pomáhá mladý ječmen v léčbě anémie [22]. Zelený ječmen podporuje spánek, reguluje krevní tlak, posiluje imunitu a dodává energii. Dále má příznivý vliv na alergie, kožní nemoci, srdečně cévní choroby, nádorová onemocnění, nadváhu, diabetes a mnoho dalších [22; 26; 27].

2.2.2.5 Chlorella

Chlorella neboli *Chlorella vulgaris* je sladkovodní řasa, která se řadí k nejstarším organismům na Zemi. Její název je odvozený od chlorofylu, protože obsahuje nejvíce tohoto zeleného barviva z celé rostlinné říše. Chlorella je bohatým zdrojem proteinů, které tvoří zhruba 60 % její hmotnosti. Obsahuje nejen všechny esenciální aminokyseliny, ale i vitamíny, minerály, vlákninu, kyselinu gallovou, rutin, ribonukleové kyseliny, antioxidanty a zcela unikátní komplex látek označovaný CGF (růstový faktor chlorelly), který napomáhá k rychlému

a zdravému růstu dětí a mláďat. Chlorella má díky svému jedinečnému složení příznivý vliv při léčbě mnoha nemocí, jako je anémie, artróza, diabetes a kvasinková infekce. Dále napomáhá vylučovat škodliviny, podporuje buněčný růst a zpomaluje stárnutí [22; 26].

2.2.2.6 Spirulina

Jedná se o sladkovodní sinici, jejíž název byl odvozen od spirálovitého tvaru, který zaujímají namnožené kolonie buněk. Řadí se mezi modrozelené řasy, jelikož kromě chlorofylu obsahuje i modré barvivo fytycyanin. Spirulina má vysokou výživovou hodnotu. Ta je způsobena vysokým podílem bílkovin a absencí celulózy v buněčné stěně, což usnadňuje vstřebávání živin. Stejně jako u chlorelly je podíl bílkoviny ve spirulině nejvyšší ze všech živých organismů a pohybuje se v rozmezí 50 až 70 %. Proteiny jsou důležité nejen pro stavbu enzymů, ale i pro tvorbu svaloviny. Dále obsahuje vysokou koncentraci vitamínů, minerálů, sacharidů, enzymů a dalších složek. Z fenolických látek obsahuje kyselinu gallovou, katechin a kyselinu salicylovou. Spirulina má schopnost podpořit nárůst počtu červených krvinek, zvyšuje imunitu a zmírňuje projevy alergií [22; 26].

2.3 Synbiotika

Termín synbiotikum se používá, jestliže výrobek obsahuje jak probiotika, tak prebiotika. Pokud je symbiotický vztah zamýšlen, měl by být vědecky ověřen. Živý mikrobiální kmen se dává do kombinace s prebiotikem, které je pro něj specifické. Příkladem je fruktooligosacharid s kmenem bifidobakterie a laktikol v kombinaci s laktobacilem [1; 10].

2.4 Dětská výživa

Výživa je jedním z významných faktorů, které ovlivňují růst a vývoj dítěte od narození až do dospělosti. Nenahraditelnou funkci ve výživě dětí má mateřské mléko, které má příznivé nutriční a imunologické vlastnosti. Uvádí se, že všechny děti by měly být kojeny do 6 měsíců. Po této době by mělo kojení pokračovat do 2 let věku dítěte s postupným zaváděním nemléčného příkrmu [10].

V kojeneckém období roste potřeba energie více než dvakrát, kdežto v dalších letech se zvyšuje zhruba o 10 % za rok. Během prvního roku života se ze strany dětí začíná projevovat zájem o mnohem širší spektrum potravin [28]. Současně je dobré mít na paměti, že spotřeba tuků je do dvou let vysoká a není nutné příjem nějakým způsobem omezovat. Při výběru stravy musíme upřednostňovat takové potraviny, které jsou bohatým zdrojem vápníku, železa,

zinku a vitamínů B6, B12 a D. Po dosažení věku dvou let je doporučováno, aby energetický podíl tuků nepřesahoval 30 % [29].

V období od 1,5 roku do 3 let je pro děti určena strava batolat. Jejich výživa má obsahovat jídla snadno stravitelná a měkká, nenáročná na kousání. Strava má být biologicky hodnotná a pestrá. Zároveň by měla splňovat požadavky na racionální dětskou výživu [29].

Výrobky určené dětem do 3 let věku, které byly dovezené nebo vyrobené musí splňovat hygienické požadavky prováděcího právního předpisu, vyhlášky MZ č. 84/2001 Sb., o hygienických požadavcích na hračky a výrobky pro děti do 3 let. Také by měl splňovat požadavky na složení a označení výrobků dané vyhláškou 54/2004 Sb. Dané výrobky musí vyhovovat požadavkům z hlediska složení, vlastností, mikrobiologické čistoty a nesmí způsobit poškození zdraví [30].

Děti předškolního věku (od 3 do 6 let) by měly jíst v menších porcích a několikrát denně, jelikož mají malou kapacitu žaludku a velmi střídavou chuť k jídlu. V tomto věku by dítě mělo jíst až 5krát denně. Svačina by měla tvořit významnou část jako hlavní jídlo [10].

2.4.1 Dětské výrobky obohacené o probiotika a prebiotika

Probiotické preparáty rozeznáváme jednosložkové a vícesložkové podle toho, zda obsahují jeden nebo více kmenů. Většina probiotických a prebiotických preparátů je v České republice do oběhu uváděna jako potravinový doplněk. Toto označení zhoršuje přehlednost na trhu ve srovnání se situací, kdy by se jednalo o registrované léčivo [31]. V USA ani v EU dosud probiotika nemají platný status léčiv nebo zdravotní potvrzení. V České republice se použití probiotik vymezuje Vyhláškou č. 446/2004 Sb. [32]. Ta stanovuje požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin potravními doplňky.

Dětské doplňky stravy s obsahem probiotik a prebiotik se na trhu vyskytují ve formě prášku, kapslí, tablet nebo kapek [33].

Prebiotika jako fruktooligosacharidy nebo galaktooligosacharidy jsou přidávány například do umělých kojeneckých výživ. I když zde úplně nenahradí mateřské oligosacharidy, mají alespoň vliv na podporu bifidobakterií ve střevě [34].

2.5 Význam probiotik v prevenci a léčbě dětských nemocí

2.5.1 Průjmová onemocnění spojená s užíváním antibiotik

Nejčastějším vedlejším účinkem antibiotické terapie je průjem. V kojeneckém a batolecím věku se projevuje u 8–30 % pacientů. Studie ukázaly, že probiotika jsou účinným

prostředkem v prevenci průjmového onemocnění. Nejčastěji byly využívány kmeny *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus rhamnosus* a *Saccharomyces boulardii*. [4; 7].

2.5.2 Alergická onemocnění

Alergickými onemocněními trpí asi 20 % populace. Jak bylo zjištěno, alergie doprovází změny složení střevní mikroflóry těsně po narození, kdy je absence bifidobakterií a naopak převládá výskyt klostridií. Velké množství studií je zaměřeno na probiotické bakterie. Ty ukazují, že probiotika napomáhají vývoji imunitního systému už v kojeneckém období a zároveň zlepšují slizniční bariéru. Po narození byl snížen výskyt alergií, a to až do dvanáctého roku života, pomocí aplikace nepatogenní *E. coli* [34; 35].

2.5.3 Intolerance laktózy

Laktózová intolerance je způsobena omezenou funkcí enzymu β -galaktosidázy. To se projeví neschopností štěpit laktózu na monosacharid glukózy a galaktózy. Po konzumaci mléka a jiných mléčných výrobků se intolerance laktózy projeví bolestmi břicha a průjmem. Východiskem je požití probiotických bakterií, které sami o sobě obsahují enzym β -galaktosidázu. Pomocí tohoto enzymu štěpí laktózu v tlustém střevě a zlepšují toleranci laktózy [10; 36].

2.5.4 Nádorová onemocnění

U nádorových onemocnění se uvádí, že *L. rhamnosus* a *Bifidobacterium animalis* mají pozitivní vliv na biomarkery spojenými s tímto onemocněním. Do patogeneze karcinomu bývá zapojen *Bacteroides*, *Streptococcus bovis* a *Helicobacter pylori*. Laktobacily a bifidobakterie naopak tento proces inhibují a je nutné zmínit, že v tomto případě mají probiotika spíše preventivní, než terapeutický účinek [34].

2.5.5 Nespecifické střevní záněty

Příčina tohoto onemocnění je zatím neznámá. Nejpravděpodobnější teorií je dysregulace imunitní odpovědi na běžné bakteriální antigeny. Předpokládá se, že modulací komenzální střevní mikroflóry můžeme snížit zánětlivou odpověď [4].

2.6 Enkapsulace

Enkapsulace neboli zapouzdření je proces, kdy dochází k obalení biologicky aktivních látek ochrannou membránou. Tento proces se hojně využívá v potravinářském průmyslu pro zlepšení dodávání bioaktivních molekul (například antioxidantů, minerálů, vitamínů,

ale i probiotik) do potravin. Vyrobené částice mají většinou průměr od několika nm až do několika mm. Cílem enkapsulace je zachovat stabilitu bioaktivních sloučenin během zpracování nebo skladování. Bioaktivní potravinářské sloučeniny jsou většinou charakterizovány rychlou inaktivací. Zapouzdření těchto sloučenin je prospěšné z důvodu zpomalení degradačních procesů (například oxidace nebo hydrolyzy) a zabránění degradace do doby doručení produktu na požadovaná místa [37].

2.6.1 Materiály pro enkapsulaci

Materiály využívané k zapouzdřování musí být biologicky rozložitelné a schopny vytvořit bariéru mezi vnitřní fází a okolním prostředím. K enkapsulaci se využívají například bílkovinné (želatina, lepek, kasein), lipidové (mastné kyseliny, vosky, glyceridy a fosfolipidy) a polysacharidové materiály. Mezi polysacharidové materiály pro potravinářské aplikace patří alginát, který byl využit i v experimentální části [37].

2.6.2 Alginát

Alginát je lineární polysacharid skládající se ze zbytků α -L-guluronové a β -D-mannuronové kyseliny spojenými 1-4 vazbami. Alginát je ve vodě rozpustný. Je extrahován z hnědých mořských řas (*Phaeophyceae*), ale je možné ho získat i produkcí bakteriemi *Azotobacter* nebo *Pseudomonas*. Své uplatnění našel ve farmacii i v potravinářství. Alginátové částice lze získat indukčním gelovatěním s vápenatými ionty. Pro přípravu částic se využívá technika extruze, kdy je hydrokoloidní roztok vytlačován do lázně obsahující srážecí roztok [38].

3 CÍL PRÁCE

Cílem práce je připravit složku potravy s obsahem směsi probiotických bakterií a prebiotik vhodnou jako přídavek do výrobků pro dětskou výživu.

V rámci této diplomové práce byly řešeny následující dílčí úkoly:

- literární rešerše zaměřená na charakterizaci probiotických bakterií, jejich biologických účinků a na dětské výrobky obohacené o probiotika a prebiotika
- optimalizace kultivace, zpracování a stabilizace probiotik
- analýza probiotik ve vybraných výrobcích pro dětskou výživu
- vliv různých typů prebiotik na viabilitu probiotik, stabilizace kombinovaných preparátů
- vyhodnocení a diskuze výsledků

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie

ABTS – Sigma-Aldrich (SRN)

Acetonitril – Honeywell (SRN)

Alginát sodný – Sigma-Aldrich (USA)

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát – p.a., Lach:Ner (ČR)

D-glukóza monohdrát – p.a., Lach:Ner (ČR)

Epikatechin – Sigma-Aldrich (SRN)

Epikatechin galát – PhytoLab (SRN)

Ethanol 96% – p.a., PENTA (ČR)

Fenol – p.a., Lach:Ner (ČR)

Folin- Ciocalteu činidlo – VWR Chemicals (F)

n-Hexan pro HPLC – p.a., PENTA (ČR)

Hydrogenarseničnan sodný heptahdrát – Sigma-Aldrich (IND)

Hydrogenuhličitan sodný – p.a., PENTA (ČR)

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahdrát – Lach:Ner (ČR)

Chlorid vápenatý dihydrát – p.a. Lachema (ČR)

Katechin hydrát – Sigma-Aldrich (SRN)

Kofein – Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina ferulová – Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina gallová monohdrát – Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina chlorogenová – Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina chlorovodíková 35% – p.a., Lach:Ner (ČR)

Kyselina kávová – Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina kumarová – Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina sinapová – Sigma-Aldrich (SRN)

Kyselina sírová 96% – Lach:Ner (ČR)

Kyselina trifluoroctová 99% – Lach:Ner (ČR)

Methanol pro HPLC – Sigma-Aldrich (SRN)

Molybdenan amonný tetrahydrát – Lach:Ner (ČR)

MRS Broth médium – Himedia (IND)
Pankreatin – Sigma-Aldrich (SRN)
Pepsin – Sigma-Aldrich (SRN)
Peroxidisíran draselný – p.a., Lach:Ner (ČR)
Propidiumjodid – eBioscience (USA)
Rutin hydrát – Sigma-Aldrich (SRN)
Saponarin – PhytoLab (SRN)
Síran měďnatý pentahydrát – Lach:Ner (ČR)
Síran sodný bezvodý – Lach:Ner (ČR)
Trolox – Sigma-Aldrich (SRN)
Uhličitan sodný bezvodý – p.a., PENTA (ČR)
Vínan sodno-draselný tetrahydrát – p.a., Lachema (ČR)
Žlučové soli – směs kyseliny cholové a deoxycholové, Sigma-Aldrich (SRN)

4.2 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy, Boeco (SRN)
Běžné laboratorní sklo
Centrifuga - U-32R, Boeco (SRN)
Centrifuga vysokorychlostní chlazená Z36HK – Hermle (SRN)
ELISA Reader ELx808, BioTek (SRN)
Enkapsulátor B-395 Pro – Büchi (Š)
Laminární box Aura mini – BioAir (I)
Lyofilizátor FreeZone, Labconco (USA)
Magnetická míchačka, Lavat (ČR)
Optický mikroskop Intraco Micro LM 666 PC/∞ LED s kamerou AM 4023T (ČR)
Průtokový cytometr NL-2000, Cytex Biosciences (NL)
Předvážky Ohaus ScoutPro (USA)
Sestava pro HPLC/UV-VIS, Thermo Fisher Scientific (ČR)
Spektrofotometr – NanoPhotometr UV/VIS, IMPLEN (SRN)
Temperovaná třepačka, Heidolph Inkubator 1000 (SRN)
Termostat INCU-Line, VWR (USA)

4.3 Použité probiotické kultury

V experimentální části práce byly testovány probiotické bakteriální kultury *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833, *Lactobacillus casei* CCM 4798 a *Bifidobacterium breve* CCM 7825^T. Všechny tyto kultury pocházely z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

4.4 Použité probiotické doplňky stravy pro děti

K testování probiotických doplňků stravy byly využity komerční probiotické preparáty ve formě kapek a prášku, které z hlediska složení bakteriální kultury nejvíce odpovídaly testovaným kmenům. Probiotické preparáty jsou běžně dostupné v lékárnách.



Obrázek 5: Použité probiotické doplňky stravy pro děti. Zleva: LAKTOBACÍLKY BABY sáčky, OSMOBIOTIC FLORA BABY kapky.

4.4.1 LAKTOBACÍLKY BABY sáčky

Tento probiotický přípravek ve formě prášku od značky Swiss NatureVia je vhodný pro děti již od narození. Složení tohoto doplňku stravy je uvedeno v Tabulce 3.

Tabulka 3: Složení probiotického doplňku stravy LAKTOBACÍLKY BABY sáčky

Složení		Množství v denní dávce (1 sáček)
Bakteriální kultura	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 45 %	1,00·10 ⁹ CFU
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 15 %	
	<i>Lactobacillus casei</i> 15 %	
	<i>Bifidobacterium infantis</i> 15 %	
	<i>Bifidobacterium bifidum</i> 10 %	
Prebiotikum	Fruktooligosacharidy	36,00 mg

Dalšími složkami je maltodextrin a kukuřičný škrob.

4.4.2 OSMOBIOTIC FLORA BABY kapky

Jedná se o doplněk stravy značky Boiron určený pro děti od 1 měsíce. Obsahuje 2 bakteriální kmeny, které byly zpracovány pomocí technologického postupu mikroenkapsulace (viz Tabulka 4).

Tabulka 4: Složení probiotického doplňku stravy OSMOBIOTIC FLORA BABY kapky

Složení		Množství v denní dávce (5 kapek)
Bakteriální kultura	<i>Lactobacillus casei</i>	2,50·10 ⁸ CFU
	<i>Bifidobacterium breve</i>	2,50·10 ⁸ CFU

Dalšími složkami je maltodextrin a kukuřičný olej.

4.5 Použité prebiotické produkty

Pro přípravu rostlinných extraktů s možným prebiotickým účinkem bylo použito 6 prášků superpotravin, které byly zakoupeny ve specializovaných prodejnách se zdravou výživou (viz Tabulka 5).

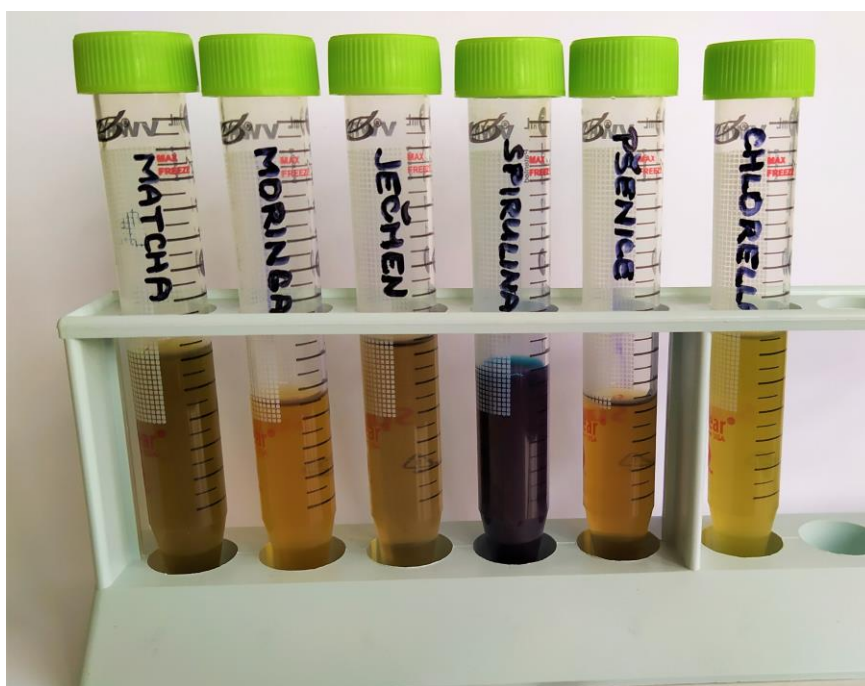
Tabulka 5: Prebiotické produkty

Vzorky	Výrobce
Matcha	Matcha Tea
Moringa	Zdravý den [®]
Mladá pšenice	Les Fruits du Paradis
Mladý ječmen	Les Fruits du Paradis
Chlorella	Natu
Spirulina	Natu

Vybrané vzorky jsou bohatým zdrojem vlákniny, antioxidantů, chlorofylu, vitamínů a minerálních látek.

4.6 Příprava extraktů

Z vybraných superpotravin byly připraveny vodné a ethanolové extrakty. Rostlinné extrakty byly připraveny 24hodinovou extrakcí 1 g rostlinného prášku v 10 ml destilované vody nebo 20% ethanolu.



Obrázek 6: Vzorky rostlinných extraktů. Zleva: extrakt z matchy, extrakt z moringy, extrakt z mladého ječmene, extrakt ze spiruliny, extrakt z mladé pšenice, extrakt z chlorelly.

4.7 Charakterizace extraktů

Připravené rostlinné extrakty prebiotických produktů byly charakterizovány z hlediska celkového obsahu sacharidů, redukujících sacharidů, celkových fenolických látek, jednotlivých fenolických látek a antioxidační aktivity.

4.7.1 Stanovení sacharidů

Celkový obsah sacharidů i obsah redukujících sacharidů byl stanoven spektrofotometricky. Standardem pro sestrojení kalibrační závislosti je v obou případech glukóza.

4.7.1.1 Stanovení celkových sacharidů metodou dle Duboise

Tato metoda je založena na dehydrataci sacharidů koncentrovanou kyselinou sírovou a následné kondenzaci vzniklého furfuralu s fenolem za vzniku barevných kondenzačních produktů, které lze stanovit spektrofotometricky [39].

Do zkumavky s 1 ml analyzovaného vzorku byl přidán 1 ml 5% fenolu a 5 ml koncentrované H_2SO_4 . Obsah zkumavky byl pomocí vortexu promíchán a ponechán 30 minut stát při laboratorní teplotě. Poté byla změřena absorbance zbarveného roztoku při vlnové délce 490 nm oproti blanku, kde byla místo vzorku přidána destilovaná voda. Každý vzorek byl analyzován třikrát a ze získaných hodnot byl vypočten průměr i směrodatná odchylka. Ze standardního roztoku glukózy byla připravena kalibrační řada v koncentračním rozmezí od 0,02 do 0,1 mg/ml. Koncentrace neznámých vzorků byla vypočtena z rovnice regrese získané sestrojením grafu kalibrační závislosti absorbance na koncentraci.

$$\begin{aligned}y &= 9,041x \\ R^2 &= 0,999\end{aligned}\tag{1}$$

4.7.1.2 Stanovení redukujících sacharidů metodou dle Somogyi-Nelsona

Tato metoda je založena na redukci měďnatých solí. Vznikající měďnatá sůl vytváří s Nelsonovým činidlem modrozelený komplex, který se pak stanoví spektrofotometricky [39].

Do zkumavky byl napipetován 1 ml vzorku a 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla I a II. Roztok byl na 10 minut umístěn do vroucí lázně a následně byl tekoucí vodou ochlazen na laboratorní teplotu. K ochlazenému roztoku bylo přidáno 0,5 ml Somogyi-Nelsonova činidla III. Vyloučený Cu_2O byl důkladně rozpuštěn promícháním na vortexu a celý roztok byl poté doplněn destilovanou vodou na celkový objem 10 ml. Následně byla proměřena absorbance při vlnové délce 720 nm oproti blanku, kterým byla destilovaná voda. Ze standardního roztoku glukózy byla připravena kalibrační řada v koncentračním rozmezí od 0,002 do 0,01 mg/ml. Koncentrace neznámých vzorků byla vypočtena z rovnice regrese získané sestrojením grafu kalibrační závislosti absorbance na koncentraci.

$$\begin{aligned}y &= 21,565x \\ R^2 &= 0,990\end{aligned}\tag{2}$$

4.7.1.3 Příprava roztoků pro stanovení redukujících sacharidů dle Somogyi-Nelsona

Somogyi-Nelsonovo činidlo I

Ve 100 ml destilované vody bylo rozpuštěno 12 g uhličitanu sodného, 8 g hydrogenuhličitanu sodného a 6 g vlnanu sodno-draselného. 72 g síranu sodného bylo rozpuštěno v 300 ml destilované vody. Oba roztoky byly následně smíchány.

Somogyi-Nelsonovo činidlo II

4 g pentahydrátu síranu měďnatého byly smíchány s 24 g síranu sodného. Směs byla rozpuštěna v 200 ml destilované vody.

Somogyi-Nelsonovo činidlo III

Ve 450 ml destilované vody bylo rozpuštěno 25 g molybdenanu amonného. Do roztoku bylo přidáno 21 ml koncentrované kyseliny sírové. 3 g heptahydrátu hydrogenarseničnanu sodného byly rozpuštěny v 25 ml destilované vody. Oba roztoky byly smíchány a ponechány 48 hodin ve tmě při laboratorní teplotě.

4.7.2 Stanovení celkových fenolických látek

Celková koncentrace polyfenolů se stanovuje spektrofotometricky po reakci Follin-Ciocaltautova činidla se vzorkem, kdy se proměří intenzita zbarvení roztoku. Standardem pro sestrojení kalibrační závislosti je kyselina gallová.

K 1 ml Follin-Ciocaltautova činidla zředěného vodou v poměru 1:9 byl přidán 1 ml destilované vody a 50 μ l vzorku. Obsah zkumavky byl pomocí vortexu promíchán a ponechán 5 minut stát při laboratorní teplotě. Poté byl do zkumavky přidán 1 ml nasyceného roztoku uhličitanu sodného. Po opětovném promíchání byl roztok ponechán 15 minut při laboratorní teplotě. Následně byla změřena absorbance roztoku při vlnové délce 750 nm. Každý vzorek byl analyzován třikrát a ze získaných hodnot byl vypočten průměr i směrodatná odchylka. Ze standardního roztoku kyseliny gallové byla připravena kalibrační řada v koncentračním rozmezí od 0,1 do 0,7 mg/ml. Koncentrace neznámých vzorků byla vypočtena z rovnice regrese získané sestrojením grafu kalibrační závislosti absorbance na koncentraci.

$$\begin{aligned}y &= 1,597x \\ R^2 &= 0,994\end{aligned}\tag{3}$$

4.7.3 Stanovení jednotlivých fenolických látek pomocí HPLC s UV-VIS detekcí

Jednotlivé vybrané fenolické látky byly stanoveny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detekcí. Sledovanými fenolickými látkami byly: epikatechin,

epikatechin galát, katechin, kofein, kyselina ferulová, kyselina gallová, kyselina chlorogenová, kyselina kávová, kyselina kumarová, kyselina sinapová, rutin a saponarin. Standardy těchto látek byly rozpuštěny v methanolu, naředěny v koncentračním rozmezí 0,25–0,01 mg/ml a proměřeny společně s analyzovanými vzorky. Připravené vodné a ethanolové extrakty bylo nutno před měřením přečistit přidavkem hexanu v poměru 1:1. Po protřepání byl ve stejném poměru do směsi přidán 70% methanol, který byl naředěn Mili-Q vodou. Po dalším protřepání byla ze směsi odebrána vodná část, která byla následně přefiltrována přes nylonový filtr s velikostí pórů 0,45 µm. Všechny vzorky byly nejprve 3x zředěny demineralizovanou Mili-Q vodou, odpipetovány do vialek a následně umístěny do autosampleru HPLC.

Pro analýzu byl využit nástřik vzorku o objemu 20 µl. Dělení směsi probíhalo na koloně Kinetex F5 (2,6 µm, 4,6 x 150 mm) při 35 °C. Mobilní fázi tvořila směs 0,1% vodného roztoku kyseliny trifluoroctové a acetonitrilu v poměru 90:10 s postupnou gradientovou elucí na poměr 30:70, jejíž průtok byl nastaven na 0,4 ml/min. Vzorky byly detekovány na UV/VIS detektoru při vlnové délce 260 nm a 280 nm. Analýza probíhala 30 minut. Naměřená data byla zpracována pomocí programu Chromeleon. Ze získaných chromatogramů byly zjištěny plochy píků. Pro kvantitativní stanovení koncentrace vybraných fenolických sloučenin byly ze standardů sestrojeny kalibrační křivky, díky nimž bylo možné vypočítat zastoupení vybraných flavonoidů v jednotlivých vzorcích. Kalibrační křivky některých fenolických látek jsou uvedeny v Příloze 1.

Tabulka 6: Rovnice kalibračních křivek vybraných fenolických sloučenin

Epikatechin	$y = 994,3x$	Kyselina chlorogenová	$y = 767,9x$
Epikatechin galát	$y = 1761,4x$	Kyselina kávová	$y = 4280,4x$
Katechin	$y = 2924,3x$	Kyselina kumarová	$y = 4705,9x$
Kofein	$y = 6016,3x$	Kyselina sinapová	$y = 1944,7x$
Kyselina ferulová	$y = 4610,7x$	Rutin	$y = 2180,8x$
Kyselina gallová	$y = 4274,4x$	Saponarin	$y = 2602,0x$

4.7.4 Stanovení antioxidační aktivity

Ke stanovení antioxidační aktivity se využívá činidlo ABTS⁺. Standardním roztokem pro sestrojení kalibrační závislosti je trolox.

ABTS byl rozpuštěn v destilované vodě na koncentraci $c = 7$ mmol/l. Pro získání radikálového kationtu byl roztok smíchán s 2,45 mmol/l peroxodisíranem draselným

a ponechán ve tmě nejméně 12 hodin. Roztok ABTS bylo třeba před samotným měřením naředit 96% ethanolem na hodnotu absorbance přibližně 0,700 při vlnové délce 734 nm proti ethanolu. K měření byla využita zúžená kyveta, do které byl napipetován 1 ml ABTS^{•+}. Do kyvety bylo přidáno 10 µl vzorku a po 10 minutách byl zaznamenán pokles absorbance. Jako blank byl použit 1 ml ABTS^{•+} a 10 µl destilované vody. Ze standardního roztoku troloxu rozpuštěného v 60% ethanolu byla sestavena kalibrační řada v koncentračním rozmezí od 50 do 400 µg/ml.

$$y = 0,001x \quad (4)$$
$$R^2 = 0,990$$

4.8 Kultivace probiotických bakterií v tekutém médiu

Probiotické bakteriální kultury *Lactobacillus acidophilus* CCM 4833, *Lactobacillus casei* CCM 4798 a *Bifidobacterium breve* CCM 7825^T byly kultivovány v komerčním MRS médiu, které bylo připraveno podle návodu uvedeného na obale výrobku. Médium bylo v daném poměru (55,15 g MRS média na 1 000 ml vody) smícháno s destilovanou vodou v Erlenmayerově baňce a sterilováno 60 minut v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem. Připravené sterilní médium v plastových zkumavkách bylo zaočkováno 10% inokulem dané probiotické kultury. Kultivace probíhala v termostatu při 37 °C po dobu 24 hodin. Po inkubaci byly kultury připraveny k dalším experimentům.

Práce s probiotickými bakteriemi probíhala ve sterilním laminárním boxu. Při práci s kulturami bylo také nutné minimalizovat jejich kontakt se vzduchem, jelikož se jednalo o anaerobní mikroorganismy.

4.9 Stanovení viability a počtu buněk probiotických bakterií

Množství bakteriálních buněk bylo stanoveno spektrofotometricky proměřením intenzity zákalu. Toto měření bylo ověřeno pomocí průtokového cytometru, kde byla kromě počtu buněk stanovena i viabilita, tedy zastoupení živých a mrtvých buněk.

4.9.1 Spektrofotometrické stanovení zákalu

Vzorky ke spektrofotometrickému stanovení viability bakterií byly v triplicátech napipetovány na 96 jamkovou destičku. Růst bakterií v podobě změny zákalu byl sledován při 630 nm v čase 0 a po 24 hodinách pomocí přístroje ELISA Readeru. Z rozdílu hodnot absorbancí byl vyhodnocen nárůst, případně úbytek bakteriálních buněk.

4.9.2 Průtokový cytometr

Pro stanovení množství buněk a jejich viability byl použit průtokový cytometr, který jako fluorescenční barvivo využívá propidiumjodid. Vzorek s bakteriálními buňkami byl vhodně naředěn demineralizovanou Mili-Q vodou. K 1 ml naředěného vzorku bylo přidáno 5 μ l propidiumjodidu o koncentraci 1 mg/ml. Obarvené vzorky byly ponechány 10 minut ve tmě a poté byly analyzovány na průtokovém cytometru, kde byl stanoven počet i procentuální zastoupení živých a mrtvých buněk.

4.10 Vliv rostlinných materiálů na viabilitu bakterií

Nejprve byly připraveny vodné a ethanolové extrakty prebiotických produktů podle návodu uvedeného v kapitole 4.6 a probiotické bakteriální kultury, jejichž postup je popsán v kapitole 4.8.

Do jamek mikrotitrační destičky s 96 jamkami bylo vždy v triplicátech napipetováno 230 μ l tekutého MRS média, 75 μ l probiotické kultury a 25 μ l jednotlivých extraktů prebiotických produktů. Referenčním vzorkem bylo médium s bakteriální kulturou, kde místo extraktu bylo přidáno 25 μ l daného rozpouštědla (sterilní destilovaná voda nebo 20% ethanol). Současně byly připraveny i blanky použitých extraktů, a to smísením 305 μ l MRS média s 25 μ l jednotlivých extraktů. Nárůst bakterií byl stanoven z rozdílu zákalu podle návodu v kapitole 4.9.1.

4.11 Promytí buněk

Po 24 hodinové kultivaci probiotických bakterií v tekutém médiu (provedené dle kapitoly 4.8) byly narostlé buňky zcentrifugovány při 5 000 otáčkách po dobu 10 minut. Vzniklý supernatant byl odlit a buňky byly rozsuspendovány v 10 ml sterilní destilované vody. Poté byly buňky opět zcentrifugovány při 5 000 otáčkách po dobu 10 minut. Supernatant byl odlit a promyté probiotické buňky byly použity k dalším experimentům.

4.12 Příprava alginátových částic

Promyté probiotické buňky byly rozsuspendovány ve vybraných rostlinných extraktech a smíchány v poměru 1:1 se sterilním roztokem 2% alginátu. Vzniklá směs byla převedena do zásobní láhve a důkladně promíchána. V případě referenčních vzorků byly probiotické buňky rozsuspendovány ve sterilní destilované vodě. Alginátové částice byly připraveny pomocí enkapsulátoru Büchi B-395 Pro (Obrázek 7) s tryskami o průměru 450 a 1 000 μ m. Směs byla tryskami rozprašována do 120 ml vytvrzovacího roztoku 1% CaCl₂, který byl

nepřetržitě míchán magnetickým míchátkem. Po 20 minutách byly připravené částice z vytvrzovacího roztoku zfiltróvány a uschovány k dalším experimentům.

Tabulka 7: Parametry enkapsulace

Parametr	Hodnota
Frekvence	3 300 Hz
Napětí	1 600 V
Míchání	100 %
Tlak	75 mbar



Obrázek 7: Enkapsulátor Büchi B-395 Pro

4.13 Příprava lyofilizovaných alginátových částic

Alginátové částice s enkapsulovanými probiotickými buňkami a prebiotickými produkty byly zamrazeny v plastových zkumavkách při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Částice byly následně lyofilizovány v lyofilizačních baňkách pomocí lyofilizátoru FreeZone po dobu 24 hodin za laboratorní teploty a podmínek vakua, které kolísalo kolem 0,005 mbar.

4.14 Charakterizace alginátových částic

Alginátové částice byly charakterizovány pomocí stanovení enkapsulační účinnosti fenolických látek. Následně byla sledována stabilita částic.

4.14.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost byla založena na stanovení obsahu celkových fenolických látek enkapsulovaných do částic. V jednotlivých směsích připravených pro enkapsulaci a ve vytvrzovacích roztocích po zfiltróvání hotových částic byly podle postupu v kapitole 4.7.2 stanoveny koncentrace polyfenolů. Enkapsulační účinnost byla vypočtena jako rozdíl koncentrace polyfenolů v roztoku před a po enkapsulaci.

4.15 Modelové trávení

Modelové trávení simuluje podmínky při přechodu potravy lidským gastrointestinálním traktem prostřednictvím tří modelových trávicích šťáv – šťavy žaludeční, pankreatické a žlučové.

Modelové trávení bylo aplikováno na směsi prebiotik s probiotickými buňkami v různých formách, a to na čerstvé probiotické buňky s rostlinnými extrakty, čerstvé probiotické buňky s reálnými práškovými vzorky, alginátové částice s enkapsulovanými probiotickými bakteriemi a prebiotiky, lyofilizované alginátové částice s enkapsulovanými probiotickými bakteriemi a prebiotiky, na komerční probiotické doplňky stravy a na komerční probiotické doplňky stravy s rostlinnými extrakty. Simulací trávicího procesu lze sledovat změny viability probiotických bakterií v jednotlivých částech trávicí soustavy.

4.15.1 Příprava modelových trávicích šťáv

4.15.1.1 Žaludeční šťáva

Žaludeční šťáva byla připravena rozpuštěním 0,25 g pepsinu ve 100 ml destilované vody a následným přidáním 0,84 ml 35% kyseliny chlorovodíkové. pH celého roztoku bylo upraveno na hodnotu 0,9 [40].

4.15.1.2 Pankreatická šťáva

0,25 g pankreatinu a 1,5 g NaHCO₃ bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody. pH výsledného roztoku bylo upraveno na hodnotu 8,9 [40].

4.15.1.3 Žlučová šťáva

Žlučová šťáva byla připravena rozpuštěním 0,8 g žlučových solí ve 200 ml fosfátového pufru o pH 8 [40].

4.15.2 Stanovení viability probiotických buněk s prebiotickými produkty v různých formách

4.15.2.1 Modelové trávení směsí probiotických buněk s rostlinnými extrakty

Buňky testovaných kmenů *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* a *Bifidobacterium breve* byly promyty podle postupu v kapitole 4.11 a rozsuspendovány v 10 ml destilované vody. Smícháno bylo vždy 0,5 ml probiotické kultury a 4,5 ml jednotlivých rostlinných extraktů. Referenčním vzorkem byla probiotická kultura ve 4,5 ml destilované vody.

Množství buněk bylo v probiotické kultuře nastaveno na rozmezí řádů 10^6 až 10^9 CFU. Jedná se o minimální množství buněk, které je požadováno pro probiotické přípravky [7].

Všechny připravené směsi byly promíchány a ponechány 15 minut stát při laboratorní teplotě. Po 15 minutách byl do čisté zkumavky typu Eppendorf odebrán 1 ml vzorku a do zbytku směsi byly přidány 4 ml žaludeční šťávy. Roztoky byly umístěny do termostatu a inkubovány při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 30 minut. Poté byl opět odebrán 1 ml vzorku do zkumavky typu Eppendorf. V posledním kroku modelového trávení bylo do roztoku přidáno 3,5 ml pankreatické a 3,5 ml žlučové šťávy. Připravené směsi byly poté 90 minut inkubovány na temperované třepačce při teplotě $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Směsi byly následně zcentrifugovány 5 minut při 5 000 otáčkách. Vzniklý supernatant byl odlit a ke stočeným buňkám byl napipetován 1 ml sterilní destilované vody. Vzorky odebírané při modelovém trávení představovaly sérii vzorků v jednotlivých fázích trávení, a to před trávením, během trávení a po trávení, které byly následně podrobeny další analýze. Všechny vzorky získané z jednotlivých částí modelového trávení byly v tripletech naneseny na mikrotitrační destičku. K 30 μl daného vzorku bylo přidáno 300 μl sterilního MRS média. Nárůst bakteriální kultury ve formě zákalu byl stanoven ELISA Readerem (podle kapitoly 4.9.1) a počet živých a mrtvých buněk byl stanoven na průtokovém cytometru (kapitola 4.9.2).

4.15.2.2 Modelové trávení směsí probiotických buněk s reálnými práškovými vzorky

Promytá bakteriální kultura *Bifidobacterium breve* byla připravena podle postupu v kapitole 4.11 a rozsuspendována ve sterilní destilované vodě. 10 ml probiotické kultury bylo vždy smícháno s 0,1 g jednotlivých práškových vzorků. Referenčním vzorem byla samotná bakteriální kultura.

Připravené probiotické buňky byly ve směsi s prebiotiky ponechány 1 hodinu stát. Poté byly ze směsi odebrány 2 ml do sterilní zkumavky, kam byla následně v poměru 1:1 přidána také žaludeční šťáva. Roztoky byly umístěny na 30 minut na temperovanou třepačku. Po této době byl do zkumavky typu Eppendorf odebrán 1 ml vzorku. Ke zbylým roztokům byla opět v poměru 1:1 přidána pankreatická a žlučová šťáva. Připravené směsi byly následně inkubovány 90 minut na temperované třepačce při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Směsi po trávení byly zcentrifugovány a analyzovány ELISA Readerem z hlediska spektrofotometrického stanovení zákalu stejně, jako tomu bylo v předchozí kapitole 4.15.2.1. Oproti předchozí kapitole, kde byl sledován vliv extraktu na probiotické buňky během trávení, byl v tomto případě sledován vliv samotné potraviny. Aby se zajistil co největší prostor pro kontakt práškového

vzorku s probiotickou kulturou, byly využity pouze jiné poměry vzorku prebiotik a trávících šťáv.

4.15.3 Stanovení stability částic s enkapsulovanými probiotickými bakteriemi a prebiotiky

4.15.3.1 Modelové trávení alginátových částic

Alginátové částice připravené podle návodu v kapitole 4.12 byly před modelovým trávením mechanicky narušené. Pouze největší částice (připravené tryskami o průměru 1 000 µm) byly narušeny pomocí lžičky, čímž bylo simulováno rozmělnění částic v ústech ještě před jejich spolknutím.

1 g alginátových částic s enkapsulovanými probiotiky a prebiotiky byl smíchán s 5 ml žaludeční šťávy. Vzorky byly umístěny do termostatu a inkubovány při 37 °C po dobu 30 minut. Poté byla do směsi v poměru 1:1 přidána pankreatická a žlučová šťáva. Připravené směsi byly 90 minut inkubovány na temperované třepačce. Následně byla kromě viability a počtu buněk bakteriální kultury stanovena i antioxidační aktivita, jejíž postup stanovení je uveden v kapitole 4.7.4.

4.15.3.2 Modelové trávení lyofilizovaných alginátových částic

Lyofilizované alginátové částice před modelovým trávením bylo nutné nejprve rehydratovat. 0,1 g lyofilizovaných částic byl rehydratován přídatkem 10 ml sterilní destilované vody. Rehydratace probíhala 1 hodinu a poté mohly být lyofilizované alginátové částice podrobeny modelovému trávení.

4.15.4 Modelové trávení vybraných komerčních probiotických preparátů

K otestování komerčních probiotik z hlediska modelového trávení byly použity probiotické preparáty LAKTOBACÍLKY BABY sáčky a OSMOBIOTIC FLORA BABY kapky. Probiotické produkty byly pro modelové trávení připraveny tak, že jejich doporučená denní dávka byla rozsuspendována v 10 ml sterilní destilované vody. V případě práškového přípravku byl obsah 1 sáčku rehydratován ve vodě v termostatu při 37 °C po dobu 1 hodiny. Naopak přípravek v kapalné formě nebylo již nutné dále rehydratovat, proto byla jeho denní dávka (5 kapek) rozmíchána ve vodě a ihned použita k modelovému trávení.

Pro analýzu komerčních probiotik bylo také využito modelové trávení jejich směsí s vybranými rostlinnými extrakty, a to s extraktem matchy, zeleného ječmene a spiruliny. Modelové trávení bylo provedeno podle postupů uvedených v kapitolách 4.15.2.1 a 4.15.3.2.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato diplomová práce je zaměřena na přípravu probiotických bakterií obohacených o rostlinná prebiotika a následnou stabilizaci těchto směsí do alginátových částic pro možnou aplikaci do dětských výrobků.

5.1 Charakterizace extraktů

Z rostlinných materiálů matchy, moringy, mladé zelené pšenice, mladého zeleného ječmene, chlorelly a spiruliny byly podle postupu uvedeného v kapitole 4.6 připraveny vodné a ethanolové extrakty. Tyto přírodní rostlinné extrakty šesti prášků superpotravin byly charakterizovány na obsah celkových sacharidů, redukcí sacharidů, celkových fenolických látek a vybraných jednotlivých fenolických látek.

5.1.1 Stanovení celkových sacharidů metodou dle Duboise

Spektrofotometrické stanovení celkových sacharidů metodou dle Duboise bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 4.7.1.1. Sacharidy jsou nejvíce rozpustné ve vodě, proto byly pro následující stanovení využity pouze vodné extrakty. Každý extrakt byl analyzován třikrát a ze získaných hodnot byl vypočten průměr i směrodatná odchylka. Obsah celkových sacharidů byl vypočten z rovnice regrese kalibrační křivky D-glukosy a výsledné hodnoty byly následně porovnány s hodnotami uvedenými na etiketách výrobků.

Tabulka 8: Koncentrace celkových sacharidů

Vzorek	Koncentrace celkových sacharidů [g/100 g]	
	Naměřené hodnoty	Deklarované hodnoty
Matcha	13,16 ± 0,29	NEDEKLAROVÁNO
Moringa	2,54 ± 0,78	21,0
Mladá pšenice	6,18 ± 0,05	30,0
Mladý ječmen	7,62 ± 0,04	28,0
Chlorella	5,69 ± 0,15	9,5
Spirulina	3,29 ± 0,02	12,0

Z Tabulky 8 je patrné, že nejvyšší množství celkových sacharidů bylo naměřeno u vzorku matchy (13,16 g/100 g), dále u mladé pšenice, mladého ječmene a chlorelly (okolo 6 g/100 g). Nejnižší obsah sacharidů měla moringa a spirulina, a to v průměru 3 g ve 100 g výrobku.

Ječmen a pšenice jsou obecně brány jako jaderná krmiva s vysokým obsahem sacharidů, tyto testované prášky byly však vyrobeny mletím mladé zelené trávy. Porovnáním naměřených hodnot s hodnotami deklarovanými výrobcem bylo zjištěno, že mezi výsledky

jsou patrné rozdíly. Ve většině vzorků se odchylky pohybovaly v rozmezí 73-88 %, s výjimkou chlorelly, kde byl rozdíl nejmenší (40 %). Odchylky mohly být způsobeny nižší citlivostí metody použité pro stanovení celkových sacharidů nebo nedostatečnou hydrolyzou. Dalšími možnostmi může být i to, že výrobce na obalu uvádí vyšší deklarované hodnoty, než jaké výrobek skutečně obsahuje, případně mohly hodnoty zahrnovat i nerozpustnou vlákninu.

Pro vzorek matchy nebylo možné porovnat obsah sacharidů s deklarovanou hodnotou, jelikož výrobce tyto informace na svém obalu neuvádí. V tomto případě se jednalo o zelený čaj, který je podle nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 osvobozen od požadavku na povinné deklarování výživových údajů [41].

5.1.2 Stanovení redukcí sacharidů metodou dle Somogyi-Nelsona

Stanovení redukcí sacharidů pomocí metody dle Somogyi-Nelsona bylo provedeno ve vodných extraktech podle postupu uvedeného v kapitole 4.7.1.2. Každý extrakt byl analyzován třikrát a ze získaných hodnot byl vypočten průměr i směrodatná odchylka. Obsah redukcí sacharidů byl vypočten z rovnice regrese kalibrační křivky D-glukosy a výsledné hodnoty byly následně porovnány s hodnotami uvedenými na etiketách výrobků.

Tabulka 9: Koncentrace redukcí sacharidů

Vzorek	Koncentrace redukcí sacharidů [g/100 g]	
	Naměřené hodnoty	Deklarované hodnoty
Matcha	3,43 ± 0,17	NEDEKLAROVÁNO
Moringa	0,95 ± 0,03	8,00
Mladá pšenice	1,90 ± 0,08	1,30
Mladý ječmen	3,98 ± 0,01	15,35
Chlorella	4,15 ± 0,10	1,40
Spirulina	1,65 ± 0,03	3,00

Z výsledků je patrné, že nejvyšší množství redukcí sacharidů bylo obsaženo v extraktu chlorelly (4,15 g/100 g), mladého ječmene (3,98 g/100 g) a matchy (3,43 g/100 g). Nejnižší obsah redukcí sacharidů byl stanoven u vzorku moringy na 0,95 g/100 g. Porovnáním naměřených hodnot s hodnotami deklarovanými výrobcem bylo zjištěno, že mezi výsledky jsou patrné rozdíly, i když podstatně menší než u stanovení celkových sacharidů. Nejmenší rozdíl byl pozorován u mladé pšenice (46 %). Právě ve vzorku mladé pšenice i ve vzorku chlorelly bylo stanoveno větší množství redukcí sacharidů, než jaké je deklarováno na obalech. Důvodem může být to, že se výrobce tímto způsobem chrání před uváděním nepravdivých nutričních hodnot, které kolísají dle celkové technologické úpravy a přípravy výrobku. V případě moringy, mladého ječmene a spiruliny byly naměřené hodnoty

redukujících sacharidů nižší než hodnoty deklarované. Proto lze přepokládat, že hodnota uvedená na obale nepředstavuje pouze zastoupení redukujících cukrů s volným poloacetálovým hydroxylem, ale zahrnuje i součet všech monosacharidů a oligosacharidů, které redukční účinky nemají.

Ze stanovení celkových a redukujících sacharidů jednotlivých prášků superpotravin bylo zjištěno, že vybrané vzorky jsou bohaté na obsah sacharidů a mohou sloužit jako zdroj energie pro růst probiotických bakterií. Nejlepšími prebiotiky se ukázala být matcha, mladý ječmen a chlorella, které z hlediska vyššího obsahu redukujících sacharidů mohou být pro bakterie snadněji využitelným substrátem.

5.1.3 Stanovení celkových fenolických látek

Stanovení celkových fenolických látek ve vodných extraktech bylo provedeno podle postupu v kapitole 4.7.2. Všechna měření byla provedena třikrát a ze získaných hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Výsledná koncentrace celkových polyfenolů byla vypočtena z rovnice regrese z kalibrační závislosti kyseliny gallové a přepočtena na obsah polyfenolů v 1 g vzorku.

Tabulka 10: Koncentrace celkových fenolických látek

Vzorek	Koncentrace [mg/g]
Matcha	57,0 ± 0,9
Moringa	15,8 ± 0,7
Mladá pšenice	7,1 ± 0,4
Mladý ječmen	4,9 ± 0,1
Chlorella	6,1 ± 0,3
Spirulina	12,9 ± 0,4

Z naměřených dat uvedených v Tabulce 10 je zřejmé, že na množství fenolických látek byla nejvíce bohatá matcha, která obsahovala 57,0 mg/g polyfenolů. Ta byla z hlediska obsahu polyfenolů následována moringou (15,8 mg/g) a spirulinou (12,9 mg/g). Nejnižší množství fenolických látek bylo zjištěno v mladém ječmeni, a to 4,9 mg/g.

Na spektrofotometrické stanovení celkových fenolických látek navazuje chromatografické stanovení, kde byly identifikovány vybrané jednotlivé fenolické látky.

5.1.4 Stanovení fenolických látek pomocí HPLC

Vodné i ethanolové extrakty prebiotických prášků byly dále analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV/VIS detekcí. Postup měření je popsán v kapitole 4.7.3. Každý extrakt byl analyzován třikrát a ze získaných hodnot byl vypočten

průměr i směrodatná odchylka. Zastoupení vybraných fenolických látek ve vzorku bylo vypočteno z rovnic kalibračních křivek jednotlivých fenolických sloučenin. Rovnice regrese vybraných standardů jsou uvedeny v Tabulce 6.

Tabulka 11: Koncentrace fenolických sloučenin identifikovaných ve vodných extraktech [mg/g]

Fenolické sloučeniny	Matcha	Moringa	Mladá pšenice	Mladý ječmen	Chlorella	Spirulina
Epikatechin	6,4 ± 0,1	N	N	0,6 ± 0,0	N	N
Epikatechin galát	2,6 ± 0,1	N	N	N	N	N
Katechin	0,3 ± 0,0	N	0,2 ± 0,0	0,4 ± 0,0	N	0,3 ± 0,0
Kofein	5,8 ± 0,1	N	N	N	N	N
Kyselina ferulová	0,8 ± 0,0	N	N	0,1 ± 0,0	N	N
Kyselina gallová	2,4 ± 0,1	4,0 ± 0,1	2,1 ± 0,0	3,2 ± 0,1	5,9 ± 0,1	0,9 ± 0,0
Kyselina chlorogenová	N	N	N	N	0,5 ± 0,0	0,9 ± 0,0
Kyselina kávová	N	N	0,6 ± 0,0	N	N	N
Kyselina kumarová	N	N	0,1 ± 0,0	N	N	N
Kyselina sinapová	1,5 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,04 ± 0,0	N	N	N
Rutin	2,1 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,09 ± 0,0	0,9 ± 0,0	N	N
Saponarin	6,5 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,02 ± 0,0	1,5 ± 0,0	N	N

Zkratky: N - nedetekováno

Tabulka 12: Koncentrace fenolických sloučenin identifikovaných v ethanolových extraktech [mg/g]

Fenolické sloučeniny	Matcha	Moringa	Mladá pšenice	Mladý ječmen	Chlorella	Spirulina
Epikatechin	8,5 ± 0,2	N	N	1,0 ± 0,0	N	N
Epikatechin galát	2,6 ± 0,1	N	0,1 ± 0,0	N	N	N
Katechin	N	N	0,2 ± 0,0	N	0,05 ± 0,0	0,3 ± 0,0
Kofein	7,1 ± 0,1	N	N	N	N	N
Kyselina ferulová	2,7 ± 0,1	N	0,05 ± 0,0	0,2 ± 0,0	N	N
Kyselina gallová	1,9 ± 0,0	3,0 ± 0,1	2,1 ± 0,0	2,5 ± 0,0	5,0 ± 0,1	0,5 ± 0,0
Kyselina chlorogenová	N	N	N	N	0,4 ± 0,0	0,1 ± 0,0
Kyselina kávová	N	N	1,7 ± 0,0	N	N	N
Kyselina kumarová	N	N	0,2 ± 0,0	0,7 ± 0,0	N	N
Kyselina sinapová	2,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,1 ± 0,0	N	N	N
Rutin	8,4 ± 0,2	1,3 ± 0,0	0,2 ± 0,0	N	N	N
Saponarin	11,5 ± 0,2	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0	2,3 ± 0,0	N	N

Zkratky: N - nedetekováno

Pro měření fenolických sloučenin byly využity dvě extrakční činidla (voda a 20% ethanol). Z naměřených výsledků můžeme vidět, že v ethanolových extraktech byly ve většině případů stanoveny mnohem vyšší koncentrace jednotlivých fenolických látek, než tomu bylo v extraktech vodných. To je dáno chemickou strukturou fenolických sloučenin a jejich schopností snadněji eluovat do ethanolového rozpouštědla. Změnou rozpouštědla tedy došlo k větší extrakci aktivních fenolických látek do ethanolu.

Některé fenolické látky byly v rostlinných materiálech zastoupeny ve velmi nízkých koncentracích, takže je nebylo možné detekovat. To mohlo být způsobeno mimo jiné i tím, že nedošlo k jejich uvolnění z vázaných a glykosidických forem do rozpouštědla.

Nejvíce fenolických látek bylo detekováno ve vodném extraktu matchy, a to celkem 9 sloučenin. Matcha je v porovnání s ostatními zelenými čaji velmi dobrým zdrojem širokého spektra fenolických látek, neboť je pěstována ve stínu a při její konzumaci jsou zkonzumovány celé namleté čajové lístky. Analýza extraktu z matchy byla na základě literární rešerše zaměřena na detekci epikatechinu, epikatechin galátu, rutinu a kofeinu. V nejvyšším množství byl ve vodném extraktu matchy zastoupen epikatechin (6,4 mg/g) následovaný kofeinem (5,8 mg/g). Vysoký obsah kofeinu však může být zásadním problémem pro použití tohoto rostlinného extraktu v dětské výživě. Další významnou složkou matchy se ukázal být saponarin, jehož koncentrace byla ve vodném extraktu srovnatelná s epikatechinem. V ethanolovém extraktu byla koncentrace saponarinu ještě mnohem vyšší, a to 11,5 mg/g. Obsah epikatechin galátu byl v obou typech rozpouštědla stanoven na 2,6 mg/g.

Ve vzorku moringy byla analýza zaměřena především na identifikaci rutinu a kyseliny gallové. V extraktech moringy byla nejvíce obsažena kyselina gallová, a to v koncentraci 3,0 mg/g ve vodném a 4,0 mg/g v ethanolovém extraktu. Kromě rutinu byl ve vzorku identifikován také saponarin a kyselina sinapová.

U mladé pšenice byla sledována kyselina ferulová, kumarová, sinapová a kyselina kávová. Nejvyšší množství z těchto fenolických sloučenin zaujímala kyselina kávová (0,6 mg/g). Kyselina ferulová nebyla ve vodném extraktu naměřena, protože se ve vzorku vyskytovala v malém množství a nebylo ji možné detekovat. Identifikována byla až při použití 20% ethanolu. Kyselina kumarová byla ve vodném extraktu stanovena na koncentraci 0,1 mg/g, kyselina sinapová na 0,04 mg/g a kyselina kávová na 0,6 mg/g. Mladá pšenice je podle výsledků bohatá i na katechin, rutin a saponarin.

Extrakt mladého ječmene podle Tabulky 10 obsahoval nejnížší množství polyfenolů a současně u něj bylo zjištěno široké spektrum sledovaných flavonoidů. Analýza byla v tomto vzorku zaměřena na saponarin a kyselinu ferulovou. Ve vodném extraktu byla stanovena koncentrace saponarinu na 1,5 mg/g a kyseliny ferulové na 0,1 mg/g. Ve vzorku byl dále identifikován epikatechin a kyselina kumarová. Ukázka chromatogramu pro ethanolový extrakt mladého ječmene je uvedena v Příloze 2. Podle tohoto chromatogramu můžeme vidět,

že se ve vzorku mladého ječmene nacházely i další, námi již neidentifikované fenolické sloučeniny.

Chlorella byla charakterizována z hlediska obsahu kyseliny gallové. Ta byla ve vzorku naměřena v množství 5,0 mg/g. V extraktu chlorelly byl dále identifikován katechin a kyselina chlorogenová. Katechin se nacházel v malém množství a byl analyzován pouze v ethanolovém extraktu.

Spirulina byla zaměřena na stanovení přítomnosti katechinu a kyseliny gallové. Kyselina gallová byla stanovena v koncentraci 0,9 mg/g a katechin v koncentraci 0,3 mg/g. Dále zde byla obsažena kyselina chlorogenová, a to ve stejné koncentraci jako kyselina gallová, tedy 0,9 mg/g. Z naměřených dat můžeme dále vidět, že ve chlorelle i spirulině byly stanoveny jen 3 identické fenolické sloučeniny. Tímto bylo potvrzeno i tvrzení, že chlorella a spirulina jsou z hlediska nutričního složení velmi podobné.

Ve všech vzorcích a obou extraktech rostlinných materiálů byla identifikována kyselina gallová, která byla nejvíce zastoupena ve vodných a ethanolových extraktech chlorelly a moringy.

5.1.5 Stanovení antioxidační aktivity

Celková antioxidační aktivita byla stanovena podle postupu uvedeného v kapitole 4.7.4. Všechna měření rostlinných extraktů byla provedena třikrát a ze získaných hodnot byl vypočten průměr a směrodatná odchylka. Antioxidační aktivita byla vztažena na ekvivalentní množství troloxu a stanovena v μg troloxu na 1 ml extraktu. Výsledky byly následně přepočítány na mg/g.

Tabulka 13: Antioxidační aktivita vodných extraktů

Vzorek	Koncentrace [mg/g]
Matcha	$28,8 \pm 0,0$
Moringa	$21,7 \pm 0,5$
Mladá pšenice	$16,2 \pm 0,2$
Mladý ječmen	$14,1 \pm 0,4$
Chlorella	$16,8 \pm 0,1$
Spirulina	$17,7 \pm 0,6$

Nejvyšší celková aktivita antioxidačně aktivních látek byla naměřena u extraktu z matchy (28,8 mg/g) a extraktu z moringy (21,7 mg/g). Rostlinné extrakty z mladé pšenice, chlorelly a spiruliny disponovaly velmi podobnou antioxidační aktivitou, která se pohybovala v průměru kolem 17 mg/g. Nejnižší antioxidační aktivita byla zjištěna u mladého ječmene (14,1 mg/g). V porovnání se stanovenými celkovými polyfenoly v kapitole 4.7.2

můžeme u extraktů v Tabulce 10 pozorovat velmi podobný trend posloupnosti vzorků, s výjimkou extraktu z chlorelly. Nejvyšší obsah polyfenolů naměřený u extraktu z matchy korespondoval taktéž s nejvyšší naměřenou antioxidační aktivitou. Můžeme tedy konstatovat, že antioxidační aktivita je v podstatě odrazem obsahu fenolických látek.

5.2 Vliv rostlinných materiálů na viabilitu bakterií

Po charakterizaci extraktů mohly být jednotlivé vodné a ethanolové extrakty přidávány do probiotických bakteriálních kultur *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* a *Bifidobacterium breve*, kde byla následně sledována jejich viabilita. Toto stanovení bylo provedeno podle postupu v kapitole 4.10. Přímá interakce jednotlivých rostlinných extraktů s probiotickými bakteriemi byla testována za účelem možné aplikace těchto směsí do výrobků pro dětskou výživu. V případě matchy, která obsahovala vysoké množství kofeinu, bylo uvažováno o přidavku tohoto extraktu do probiotických přípravků pro děti staršího školního věku (od 11 let), které již mohou konzumovat zelený čaj.

Nejprve bylo nutné ověřit, jestli nedojde k negativnímu ovlivnění viability použitých probiotik. Nárůst kultury v podobě změny zákalu byl sledován pomocí ELISA Readeru (kapitola 4.9.1). Samotné stanovení viability a počtu probiotických buněk bylo provedeno na průtokovém cytometru podle kapitoly 4.9.2. Výsledky byly zpracovány do tabulek. Pro lepší znázornění byly sestrojeny i grafy rozdílů absorbancí jednotlivých kultur v porovnání s referenčními vzorky.

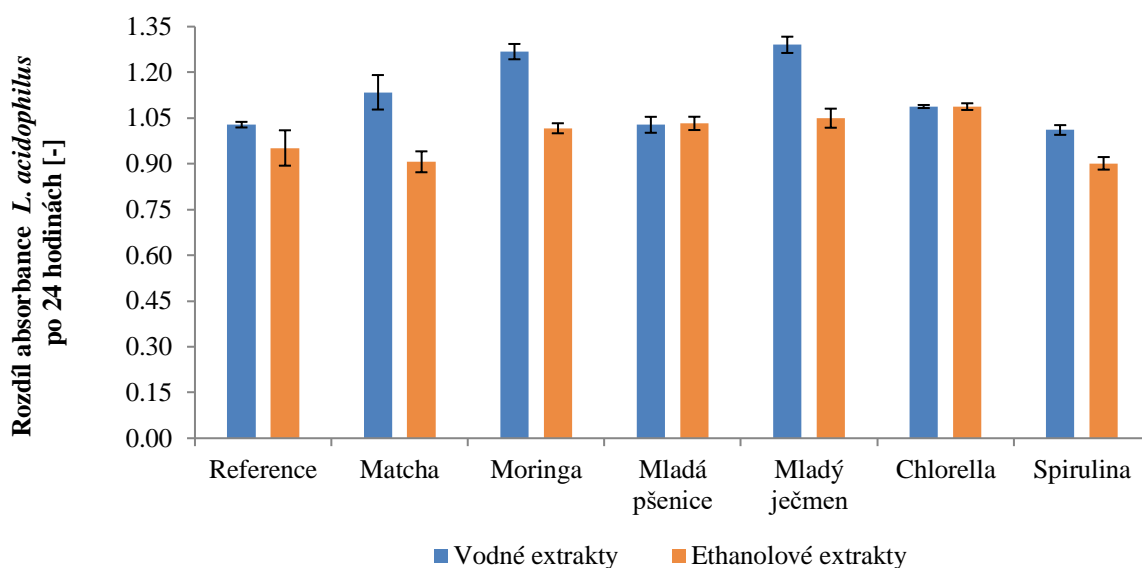
Tabulka 14: Počáteční koncentrace buněk v probiotických kulturách

Probiotická kultura	Počet buněk [CFU/ml]		Viabilita [%]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Živé	$3,86 \cdot 10^7$	73
	Mrtvé	$1,46 \cdot 10^7$	27
<i>Lactobacillus casei</i>	Živé	$2,20 \cdot 10^8$	77
	Mrtvé	$6,50 \cdot 10^7$	23
<i>Bifidobacterium breve</i>	Živé	$1,83 \cdot 10^7$	74
	Mrtvé	$6,50 \cdot 10^6$	26

Počáteční koncentrace probiotických kultur využitá pro sledování změny viability bakterií po interakci s rostlinnými extrakty vycházela u 2 kmenů z počtu 10^7 buněk. Po 24 hodinové kultivaci kultura narostla o jeden řád na 10^8 buněk. U *Lactobacillus casei* nebyl nárůst buněk po 24 hodinách tak velký, jeho koncentrace se v obou případech pohybovala v řádu 10^8 .

Příklad výstupu z průtokového cytometru pro čistou kulturu kmene *Lactobacillus acidophilus* bez přidavku prebiotika je uveden v Příloze 3.

5.2.1 Interakce prebiotik s *Lactobacillus acidophilus*



Obrázek 8: Nárůst kultury *Lactobacillus acidophilus* v přítomnosti vodných a ethanolových extraktů prebiotik po 24 hodinách kultivace

Vliv extraktů na probiotickou kulturu *Lactobacillus acidophilus* ve formě přírůstku absorbance za 24 hodin zobrazuje Obrázek 8. Počáteční koncentrace probiotické kultury byla ve všech vzorcích stejná (viz Tabulka 14).

V porovnání s referencí došlo k největšímu nárůstu kultury po přidavku vodného extraktu z mladého ječmene a extraktu z moringy. Podpora viability byla zaznamenána také u extraktu z matchy a z chlorelly. U extraktu z matchy, mladého ječmene a chlorelly byla v kapitole 5.1.2 stanovena vysoká koncentrace redukujících sacharidů, které probiotické bakterie využívají pro svůj růst a pozitivním způsobem ovlivňují viabilitu buněk. Naopak vodné extrakty mladé pšenice, spiruliny a ethanolové extrakty spiruliny a matchy nepodpořily viabilitu buněk.

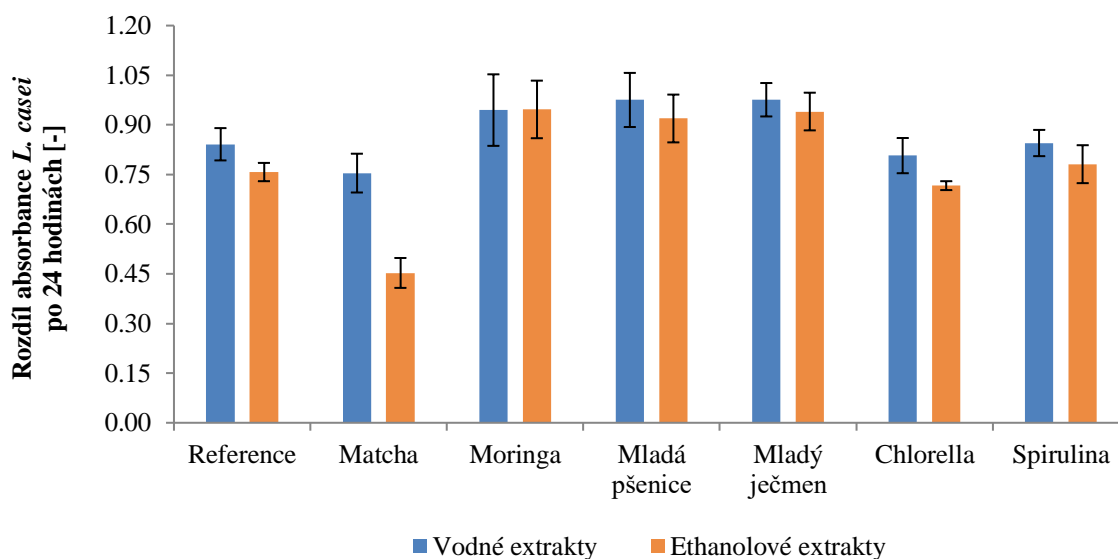
Z hodnot naměřených na průtokovém cytometru můžeme v Tabulce 15 vidět, že i když oproti referenci nedošlo ke zvýšení počtu buněk, tak nedocházelo k výrazné inhibici viability. Z toho lze usoudit, že růst probiotického kmene *Lactobacillus acidophilus* byl mírně zpomalen.

Tabulka 15: Životaschopnost bakterie *Lactobacillus acidophilus* získaná z průtokového cytometru

Vzorek	Vodné extrakty			Ethanolové extrakty				
	Počet buněk po 24 hodinách [CFU/ml]		Viabilita [%]	Počet buněk po 24 hodinách [CFU/ml]		Viabilita [%]		
Reference	$4,64 \cdot 10^8$	Ž	$3,72 \cdot 10^8$	80	$3,31 \cdot 10^8$	Ž	$2,33 \cdot 10^8$	70
		M	$9,25 \cdot 10^7$	20		M	$9,80 \cdot 10^7$	30
Matcha	$3,50 \cdot 10^8$	Ž	$2,71 \cdot 10^8$	77	$2,45 \cdot 10^8$	Ž	$2,13 \cdot 10^8$	87
		M	$7,94 \cdot 10^7$	23		M	$3,17 \cdot 10^7$	13
Moringa	$2,54 \cdot 10^8$	Ž	$2,44 \cdot 10^8$	96	$2,42 \cdot 10^8$	Ž	$2,29 \cdot 10^8$	95
		M	$1,08 \cdot 10^7$	4		M	$1,31 \cdot 10^7$	5
Mladá pšenice	$1,62 \cdot 10^8$	Ž	$1,44 \cdot 10^8$	89	$1,70 \cdot 10^8$	Ž	$1,44 \cdot 10^8$	85
		M	$1,76 \cdot 10^7$	11		M	$2,57 \cdot 10^7$	15
Mladý ječmen	$3,09 \cdot 10^8$	Ž	$2,89 \cdot 10^8$	94	$2,85 \cdot 10^8$	Ž	$2,61 \cdot 10^8$	92
		M	$1,92 \cdot 10^7$	6		M	$2,42 \cdot 10^7$	8
Chlorella	$1,41 \cdot 10^8$	Ž	$1,34 \cdot 10^8$	95	$1,31 \cdot 10^8$	Ž	$1,28 \cdot 10^8$	97
		M	$6,74 \cdot 10^6$	5		M	$3,36 \cdot 10^6$	3
Spirulina	$3,89 \cdot 10^8$	Ž	$3,28 \cdot 10^8$	84	$2,67 \cdot 10^8$	Ž	$2,40 \cdot 10^8$	90
		M	$6,09 \cdot 10^7$	16		M	$2,68 \cdot 10^7$	10

Zkratky: Ž – živé buňky, M – mrtvé buňky

5.2.2 Interakce prebiotik s *Lactobacillus casei*



Obrázek 9: Nárůst kultury *Lactobacillus casei* v přítomnosti vodných a ethanolových extraktů prebiotik po 24 hodinách kultivace

Vliv extraktů na probiotickou kulturu *Lactobacillus casei* zobrazuje Obrázek 9, který znázorňuje přírůstek absorbance za 24 hodin. Počáteční koncentrace probiotické kultury byla ve všech vzorcích stejná (viz Tabulka 14). Výrazná podpora viability oproti referenci byla stanovena u moringy, mladé pšenice a mladého ječmene. Menší nárůst kultury zaznamenal i vodný a ethanolový extrakt ze spiruliny. U extraktu matchy a chlorelly můžeme vidět,

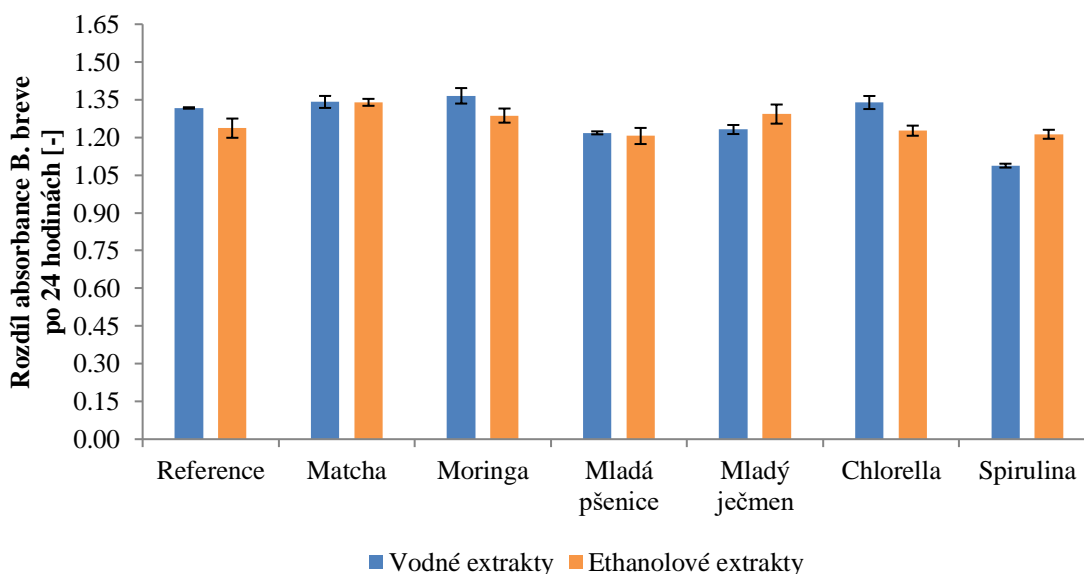
že oproti referenci nedošlo k dostatečnému nárůstu buněk a tím pádem ani k velké tvorbě zákalu pro spektrofotometrické stanovení. Z výsledků získaných ze stanovení viability na průtokovém cytometru v Tabulce 16 vidíme, že kultury obsahovaly 82–100 % živých buněk. Z toho vyplývá, že oproti referenci nedocházelo k výrazné inhibici růstu probiotických bakterií, ale spíše ke zpomalení jejich růstu.

Tabulka 16: Vliv rostlinných extraktů na životaschopnost bakterie *Lactobacillus casei*

Vzorek	Vodné extrakty				Ethanolové extrakty			
	Počet buněk po 24 hodinách [CFU/ml]		Viabilita [%]	Počet buněk po 24 hodinách [CFU/ml]		Viabilita [%]		
Reference	$3,87 \cdot 10^8$	Ž		$3,73 \cdot 10^8$	97		$2,51 \cdot 10^8$	Ž
		M	$1,31 \cdot 10^7$	3	M	$1,24 \cdot 10^7$		5
Matcha	$2,03 \cdot 10^8$	Ž	$2,03 \cdot 10^8$	100	$2,01 \cdot 10^8$	Ž	$1,93 \cdot 10^8$	96
		M	0	0		M	$7,98 \cdot 10^6$	4
Moringa	$2,73 \cdot 10^8$	Ž	$2,73 \cdot 10^8$	100	$3,15 \cdot 10^8$	Ž	$3,07 \cdot 10^8$	97
		M	0	0		M	$7,92 \cdot 10^6$	3
Mladá pšenice	$3,09 \cdot 10^7$	Ž	$3,07 \cdot 10^7$	100	$3,15 \cdot 10^8$	Ž	$3,01 \cdot 10^8$	96
		M	$1,52 \cdot 10^5$	0		M	$1,39 \cdot 10^7$	4
Mladý ječmen	$3,85 \cdot 10^8$	Ž	$3,74 \cdot 10^8$	97	$4,07 \cdot 10^8$	Ž	$3,94 \cdot 10^8$	97
		M	$1,11 \cdot 10^7$	3		M	$1,36 \cdot 10^7$	3
Chlorella	$4,15 \cdot 10^8$	Ž	$3,73 \cdot 10^8$	90	$1,60 \cdot 10^7$	Ž	$1,30 \cdot 10^7$	82
		M	$4,25 \cdot 10^7$	10		M	$2,93 \cdot 10^6$	18
Spirulina	$2,57 \cdot 10^8$	Ž	$2,26 \cdot 10^8$	88	$2,64 \cdot 10^8$	Ž	$2,32 \cdot 10^8$	88
		M	$3,17 \cdot 10^7$	12		M	$3,17 \cdot 10^7$	12

Zkratky: Ž – živé buňky, M – mrtvé buňky

5.2.3 Interakce prebiotik s *Bifidobacterium breve*



Obrázek 10: Nárůst kultury *Bifidobacterium breve* v přítomnosti vodných a ethanolových extraktů prebiotik po 24 hodinách kultivace

Nárůst kultury je znázorněn ve formě přírůstku absorbance za 24 hodin. Počáteční koncentrace probiotické kultury byla ve všech vzorcích stejná (viz Tabulka 14). Z Obrázku 10 je patrné, že v případě *Bifidobacterium breve* došlo v porovnání s referencí k podpoření růstu bakterií ve vodných a ethanolových extraktech matchy a moringy, dále ve vodném extraktu chlorelly a ethanolovém extraktu mladého ječmene. U ostatních extraktů byly probiotické bakterie jen slabě inhibovány a došlo spíše ke zpomalení jejich růstu. Data byla následně ověřena na průtokovém cytometru, kde bylo zjištěno, že viabilita probiotických bakterií se pohybovala okolo 98 % ve vodných a okolo 96 % v ethanolových extraktech.

Tabulka 17: Vliv rostlinných extraktů na životaschopnost bakterie *Bifidobacterium breve*

Vzorek	Vodné extrakty			Ethanolové extrakty				
	Počet buněk po 24 hodinách [CFU/ml]	Viabilita [%]		Počet buněk po 24 hodinách [CFU/ml]	Viabilita [%]			
Reference		$8,72 \cdot 10^7$	Ž		$8,26 \cdot 10^7$	95	$1,05 \cdot 10^8$	Ž
	M		$4,63 \cdot 10^6$	5	M			$5,22 \cdot 10^6$
Matcha	$2,10 \cdot 10^8$	Ž	$2,04 \cdot 10^8$	97	$1,76 \cdot 10^8$	Ž	$1,66 \cdot 10^8$	94
		M	$5,89 \cdot 10^6$			3	M	
Moringa	$1,80 \cdot 10^8$	Ž	$1,73 \cdot 10^8$	97	$1,19 \cdot 10^8$	Ž	$1,12 \cdot 10^8$	94
		M	$6,14 \cdot 10^6$			3	M	
Mladá pšenice	$1,27 \cdot 10^8$	Ž	$1,25 \cdot 10^8$	98	$1,47 \cdot 10^8$	Ž	$1,45 \cdot 10^8$	98
		M	$2,19 \cdot 10^6$			2	M	
Mladý ječmen	$1,29 \cdot 10^8$	Ž	$1,26 \cdot 10^8$	98	$1,33 \cdot 10^8$	Ž	$1,30 \cdot 10^8$	98
		M	$2,51 \cdot 10^6$			2	M	
Chlorella	$2,45 \cdot 10^8$	Ž	$2,37 \cdot 10^8$	97	$1,61 \cdot 10^8$	Ž	$1,53 \cdot 10^8$	95
		M	$7,80 \cdot 10^6$			3	M	
Spirulina	$1,04 \cdot 10^8$	Ž	$1,02 \cdot 10^8$	98	$1,47 \cdot 10^8$	Ž	$1,42 \cdot 10^8$	97
		M	$1,99 \cdot 10^6$			2	M	

Zkratky: Ž – živé buňky, M – mrtvé buňky

5.2.4 Vliv koncentrační řady chlorelly a spiruliny na viabilitu bakterií

Vzorky chlorelly a spiruliny při interakci s probiotiky vykazovaly ve většině případů nulový nárůst nebo úbytek bakteriální kultury oproti referenčnímu vzorku. Z toho důvodu byly vodné extrakty chlorelly a spiruliny zředěny 2x, 5x, 10x, 50x a 100x, čímž byla vytvořena koncentrační řada. Po přidavku probiotických bakterií byl následně sledován nárůst buněk a změna viability bakterií. U všech tří kmenů probiotických bakterií byla se snižující se koncentrací extraktu pozorována malá inhibice růstu buněk. V porovnání s referenčními vzorky však nedošlo k výrazné inhibici růstu kultury.

Tabulka 18: Vliv různých koncentrací extraktu chlorelly a spiruliny na *Lactobacillus acidophilus*

Vzorek	Měření zákalu	Průtokový cytometr			
	ΔA [-]	Počet buněk po 24 hodinách [CFU/ml]		Viabilita [%]	
Reference	1,079 ± 0,004	4,64·10 ⁸	Živé	3,72·10 ⁸	80
			Mrtvé	9,25·10 ⁷	20
2x Chlorella	1,088 ± 0,005	2,96·10 ⁸	Živé	2,42·10 ⁸	82
			Mrtvé	5,40·10 ⁷	18
5x Chlorella	1,099 ± 0,019	3,54·10 ⁸	Živé	2,92·10 ⁸	83
			Mrtvé	6,16·10 ⁷	17
10x Chlorella	1,103 ± 0,016	3,38·10 ⁸	Živé	2,87·10 ⁸	85
			Mrtvé	5,14·10 ⁷	15
50x Chlorella	1,085 ± 0,031	3,94·10 ⁸	Živé	3,07·10 ⁸	78
			Mrtvé	8,75·10 ⁷	22
100x Chlorella	1,099 ± 0,028	3,74·10 ⁸	Živé	2,72·10 ⁸	73
			Mrtvé	1,03·10 ⁸	27
2x Spirulina	1,011 ± 0,016	3,03·10 ⁸	Živé	2,56·10 ⁸	84
			Mrtvé	4,76·10 ⁷	16
5x Spirulina	1,094 ± 0,012	3,43·10 ⁸	Živé	2,85·10 ⁸	83
			Mrtvé	5,79·10 ⁷	17
10x Spirulina	1,089 ± 0,016	3,36·10 ⁸	Živé	2,70·10 ⁸	80
			Mrtvé	6,55·10 ⁷	20
50x Spirulina	1,095 ± 0,020	4,07·10 ⁸	Živé	3,38·10 ⁸	83
			Mrtvé	6,98·10 ⁷	17
100x Spirulina	1,075 ± 0,013	3,75·10 ⁸	Živé	3,29·10 ⁸	88
			Mrtvé	4,62·10 ⁷	12

Tabulka 19: Vliv různých koncentrací extraktu chlorelly a spiruliny na *Lactobacillus casei*

Vzorek	Měření zákalu	Průtokový cytometr			
	ΔA [-]	Počet buněk po 24 hodinách [CFU/ml]		Viabilita [%]	
Reference	0,873 ± 0,012	3,87·10 ⁸	Živé	3,73·10 ⁸	97
			Mrtvé	1,31·10 ⁷	3
2x Chlorella	0,807 ± 0,053	4,15·10 ⁸	Živé	3,73·10 ⁸	90
			Mrtvé	4,25·10 ⁷	10
5x Chlorella	0,865 ± 0,035	4,12·10 ⁸	Živé	3,88·10 ⁸	94
			Mrtvé	2,35·10 ⁷	6
10x Chlorella	0,884 ± 0,061	5,26·10 ⁸	Živé	4,99·10 ⁸	95
			Mrtvé	2,64·10 ⁷	5
50x Chlorella	0,941 ± 0,034	4,04·10 ⁸	Živé	3,87·10 ⁸	96
			Mrtvé	1,68·10 ⁷	4
100x Chlorella	0,940 ± 0,037	5,68·10 ⁸	Živé	5,29·10 ⁸	93
			Mrtvé	3,90·10 ⁷	7

2x Spirulina	0,845 ± 0,040	5,60·10 ⁸	Živé	5,47·10 ⁸	98
			Mrtvé	1,31·10 ⁷	2
5x Spirulina	0,896 ± 0,049	4,27·10 ⁸	Živé	4,14·10 ⁸	97
			Mrtvé	1,30·10 ⁷	3
10x Spirulina	0,931 ± 0,021	5,66·10 ⁸	Živé	5,45·10 ⁸	96
			Mrtvé	2,04·10 ⁷	4
50x Spirulina	0,919 ± 0,023	4,58·10 ⁸	Živé	4,32·10 ⁸	94
			Mrtvé	2,60·10 ⁷	6
100x Spirulina	0,895 ± 0,018	5,90·10 ⁸	Živé	5,56·10 ⁸	94
			Mrtvé	3,35·10 ⁷	6

Tabulka 20: Vliv různých koncentrací extraktu chlorelly a spiruliny na *Bifidobacterium breve*

Vzorek	Měření zákalu	Průtokový cytometr			
	ΔA [-]	Počet buněk po 24 hodinách [CFU/ml]	Viabilita [%]		
Reference	1,081 ± 0,009	3,38·10 ⁸	Živé	2,70·10 ⁸	80
			Mrtvé	6,81·10 ⁷	20
2x Chlorella	1,117 ± 0,016	3,08·10 ⁸	Živé	2,54·10 ⁸	83
			Mrtvé	5,38·10 ⁷	17
5x Chlorella	1,088 ± 0,014	3,32·10 ⁸	Živé	2,73·10 ⁸	82
			Mrtvé	5,89·10 ⁷	18
10x Chlorella	1,091 ± 0,005	3,94·10 ⁸	Živé	3,05·10 ⁸	77
			Mrtvé	8,87·10 ⁷	23
50x Chlorella	1,092 ± 0,013	3,86·10 ⁸	Živé	3,07·10 ⁸	80
			Mrtvé	7,87·10 ⁷	20
100x Chlorella	1,094 ± 0,008	3,55·10 ⁸	Živé	2,78·10 ⁸	78
			Mrtvé	7,67·10 ⁷	22
2x Spirulina	1,033 ± 0,029	5,68·10 ⁸	Živé	4,61·10 ⁸	81
			Mrtvé	1,06·10 ⁸	19
5x Spirulina	1,129 ± 0,012	6,74·10 ⁸	Živé	5,23·10 ⁸	78
			Mrtvé	1,51·10 ⁸	22
10x Spirulina	1,112 ± 0,012	5,06·10 ⁸	Živé	3,95·10 ⁸	78
			Mrtvé	1,11·10 ⁸	22
50x Spirulina	1,105 ± 0,003	4,76·10 ⁸	Živé	3,83·10 ⁸	81
			Mrtvé	9,24·10 ⁷	19
100x Spirulina	1,105 ± 0,026	3,53·10 ⁸	Živé	2,96·10 ⁸	84
			Mrtvé	5,64·10 ⁷	16

Z výše uvedených tabulek 18–20 můžeme vidět následující trend. U vzorků, jejichž viabilita byla podpořena přidavkem koncentrovaných extraktů (viz kapitola 5.2), bylo sledováno podpoření růstu i po přidavku extraktů naředěných 2x a 5x. Vyšší ředění extraktů už nepodpořilo viabilitu a docházelo k menší inhibici probiotických buněk. Jednalo se o kombinace extraktu chlorelly s *L. acidophilus*, chlorelly s *B. breve* a extraktu spiruliny

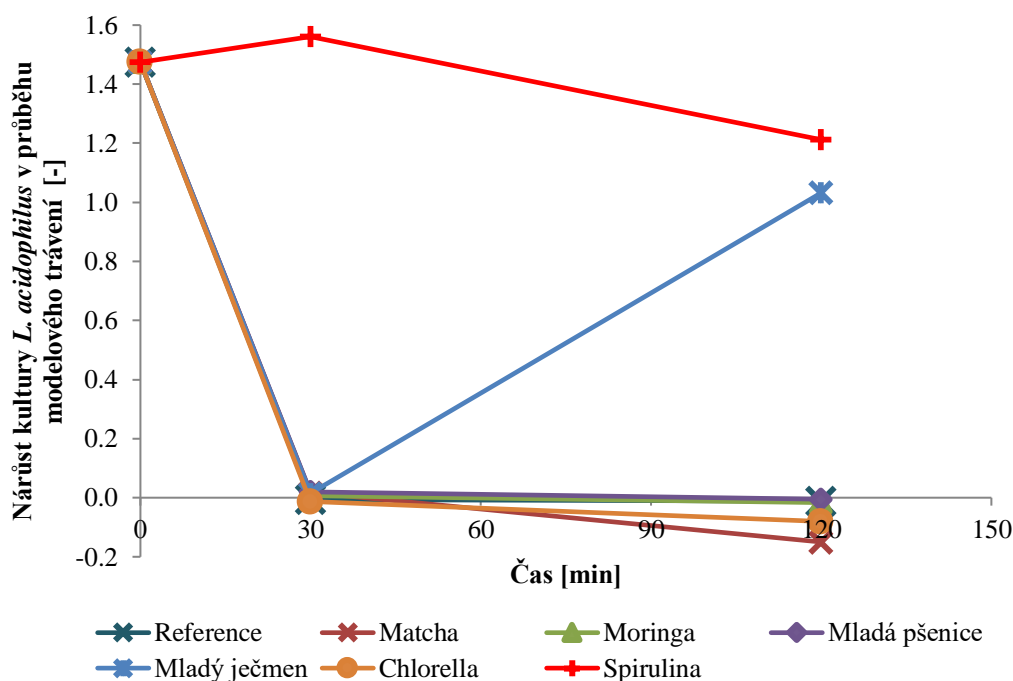
s *L. casei*. V případě probiotických bakterií *L. acidophilus* a *B. breve* s přidavkem extraktu ze spiruliny byla u koncentrovaných extraktů sledována inhibice růstu buněk a k podpoře růstu došlo naopak až u zředěnějších extraktů. Výjimkou byla kombinace extraktu chlorelly s *L. casei*.

Jelikož žádná kombinace probiotika s rostlinným extraktem nevykazovala výrazný inhibiční efekt, bylo možné sledovat viabilitu interakce probiotik s extrakty i v průběhu modelového trávení.

5.3 Modelové trávení směsí probiotických buněk s rostlinnými extrakty

V procesu modelového trávení byly nasimulovány podmínky lidského gastrointestinálního traktu pomocí tří modelových trávicích šťáv připravených podle návodu v kapitole 4.15.1. Tyto šťávy byly přidávány ke směsím probiotik s vodnými extrakty. Následně byl sledován vliv přidavku rostlinných extraktů na viabilitu probiotických bakterií z hlediska ochrany bakteriálních buněk při jejich průchodu trávicím traktem. Nárůst bakteriální kultury ve formě zákalu byl stanoven ELISA Readerem (podle kapitoly 4.9.1) a počet živých a mrtvých buněk byl stanoven na průtokovém cytometru (kapitola 4.9.2).

5.3.1 *Lactobacillus acidophilus*



Obrázek 11: Průběh modelového trávení *Lactobacillus acidophilus*

Na Obrázku 11 je znázorněn průběh modelového trávení probiotické bakterie *Lactobacillus acidophilus*. Před trávením byla koncentrace buněk ve všech vzorcích stejná, a to $2,89 \cdot 10^8$ CFU/ml. Z toho důvodu vychází všechny křivky viability v čase 0 z jednoho bodu. Po 30 minutách byla zaznamenána viabilita probiotik po interakci se žaludeční šťávou, kde ve všech vzorcích (s výjimkou spiruliny) byl zaznamenán pokles viability. V porovnání s referenčním vzorkem čisté kultury byla však u všech vzorků, kromě vzorku chlorelly, zaznamenána podpora viability. Po trávení a následné 24hodinové kultivaci při 37°C byl zaznamenán velký nárůst kultury u vzorku mladého ječmene.

Tabulka 21: Koncentrace buněk kultury *Lactobacillus acidophilus* před trávením

Před trávením	Počet buněk [CFU/ml]			Viabilita [%]
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	$2,89 \cdot 10^8$	Živé	$2,76 \cdot 10^8$
Mrtvé			$1,30 \cdot 10^7$	5

V Tabulce 21 jsou uvedeny počty buněk *L. acidophilus* před modelovým trávením naměřené na průtokovém cytometru. Tyto hodnoty sloužily jako reference pro zhodnocení průběhu trávení.

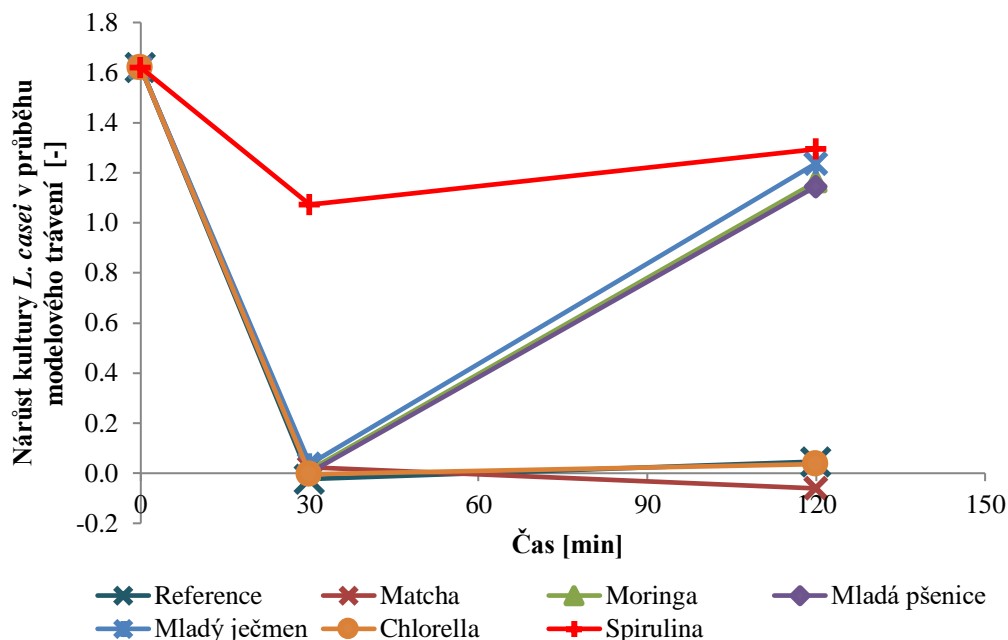
Tabulka 22: Ovlivnění růstu *Lactobacillus acidophilus* s prebiotiky po modelovém trávení a po 24hodinové kultivaci

Vzorek	Po trávení		Po trávení a 24hodinové kultivaci	
	Počet buněk [CFU/ml]	Viabilita [%]	Počet buněk po 24 hodinách [CFU/ml]	Viabilita [%]
Reference	$7,71 \cdot 10^9$	1	$6,92 \cdot 10^6$	8
Mladý ječmen	$8,57 \cdot 10^8$	22	$2,25 \cdot 10^8$	89
Spirulina	$8,71 \cdot 10^8$	28	$3,38 \cdot 10^9$	86

V Tabulce 22 můžeme vidět, že po modelovém trávení kultury *L. acidophilus* bez přidavku prebiotika došlo k usmrcení 99 % buněčné kultury. Po následné 24hodinové kultivaci při 37 °C došlo k částečnému opětovnému nárůstu a viabilita činila 8 %. U kombinace prebiotika s mladým ječmenem nebo spirulinou došlo v průběhu trávení k ochraně bakteriálních buněk. Viabilita u těchto extraktů byla v průměru 25 %. Po kultivaci došlo k podpoření růstu a zvýšení viability buněk, která se pohybovala v rozmezí od 86 do 89 %. Ostatní rostlinné materiály jako matcha, moringa, mladá pšenice a chlorella při působení

trávicích šťáv neprokázaly ochranný efekt a všechny buňky se po proměření na průtokovém cytometru jevíly jako mrtvé.

5.3.2 *Lactobacillus casei*



Obrázek 12: Průběh modelového trávení *Lactobacillus casei*

Průběh modelového trávení probiotické bakterie *Lactobacillus casei* je znázorněn na Obrázku 12. Před trávením byla koncentrace buněk ve všech vzorcích stejná (viz Tabulka 23), proto všechny křivky viability vychází v čase 0 z jednoho bodu. Po 30 minutách byla zaznamenána viabilita probiotik po interakci se žaludeční šťávou, kde ve všech vzorcích byl zaznamenán pokles viability. Nejmenšího poklesu bylo dosaženo u vzorku spiruliny. V porovnání s referencí byla ve všech vzorcích zaznamenána podpora viability zvýšením zákalu. Po trávení a následné 24hodinové kultivaci byl zaznamenán velký nárůst kultury ve formě zákalu u vzorku spiruliny, moringy, mladé pšenice a mladého ječmene.

Tabulka 23: Koncentrace buněk kultury *Lactobacillus casei* před trávením

Před trávením	Počet buněk [CFU/ml]			Viabilita [%]
	<i>Lactobacillus casei</i>	2,92·10 ⁸	Živé	
	Mrtvé		1,32·10 ⁷	5

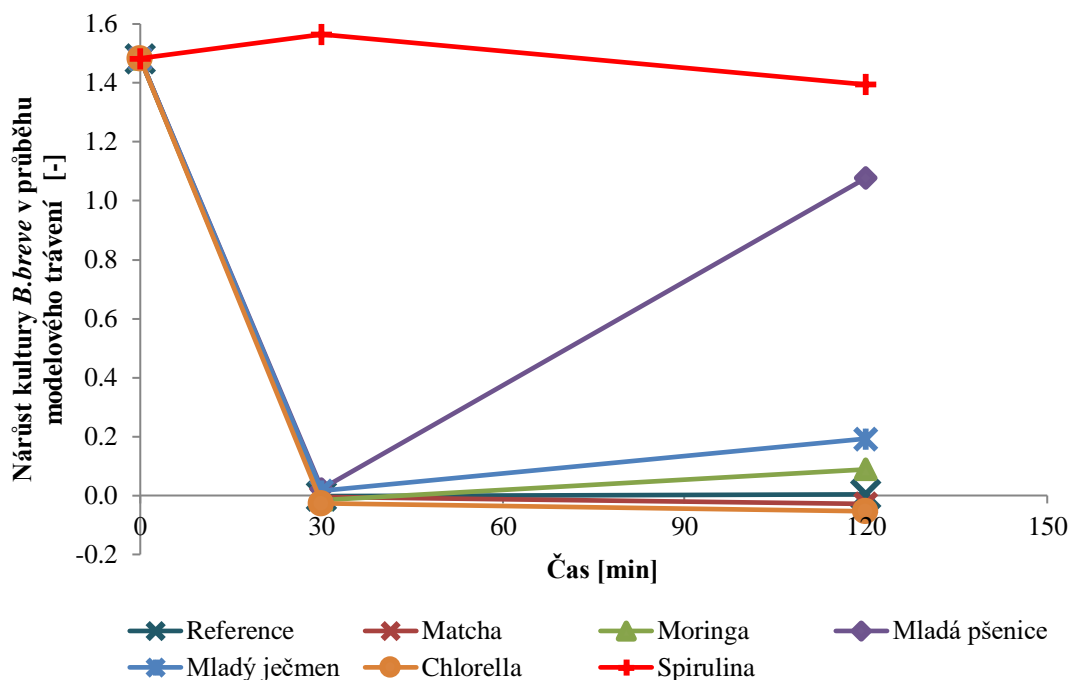
V Tabulce 23 jsou uvedeny počty buněk *L. casei* před modelovým trávením naměřené na průtokovém cytometru. Tyto hodnoty sloužily jako reference pro zhodnocení průběhu trávení.

Tabulka 24: Ovlivnění růstu *Lactobacillus casei* s prebiotiky po modelovém trávení a po 24hodinové kultivaci

Vzorek	Po trávení		Po trávení a 24 hodinové kultivaci	
	Počet buněk [CFU/ml]	Viabilita [%]	Počet buněk po 24 hodinách [CFU/ml]	Viabilita [%]
Reference	$4,38 \cdot 10^8$	2	$5,37 \cdot 10^6$	10
Moringa	$3,31 \cdot 10^8$	7	$3,07 \cdot 10^8$	63
Mladá pšenice	-	0	$3,77 \cdot 10^8$	70
Mladý ječmen	-	0	$1,19 \cdot 10^8$	82
Spirulina	$6,58 \cdot 10^8$	11	$2,17 \cdot 10^8$	86

V Tabulce 24 můžeme vidět, že po modelovém trávení kultury *L. casei* bez přidavku prebiotika došlo k usmrcení 98 % buněčné kultury. Po následné 24hodinové kultivaci při 37 °C došlo k částečnému opětovnému nárůstu a viabilita činila 10 %. U kombinace prebiotika s přidavkem moringy a spiruliny došlo v průběhu trávení k malé ochraně bakteriálních buněk. Viabilita u těchto extraktů byla v průměru 9 %. U kultury s přidavkem mladého ječmene a mladé pšenice nebyl na průtokovém cytometru zaznamenán žádný nárůst a buňky se po trávení jeví jako mrtvé. Po přidavku nových živin a následné kultivaci došlo u všech těchto extraktů k nárůstu počtu buněk a zvýšení viability. To bylo způsobeno umístěním vzorků do optimálního prostředí, kdy vlivem příznivých podmínek došlo k oživení buněk. Viabilita živých buněk se po procesu trávení pohybovala v rozmezí 63-86 %. Rostlinné materiály matchy a chlorelly při působení trávicích šťáv neprokázaly ochranný efekt a všechny buňky byly mrtvé.

5.3.3 *Bifidobacterium breve*



Obrázek 13: Průběh modelového trávení *Bifidobacterium breve*

Na Obrázku 13 je znázorněn průběh modelového trávení probiotické bakterie *Bifidobacterium breve*. Před trávením byla koncentrace buněk ve všech vzorcích stejná ($3,38 \cdot 10^8$ CFU/ml), proto všechny křivky viability vychází v čase 0 z jednoho bodu. Po 30 minutách byl sledován nárůst, případně úbytek probiotické kultury po interakci se žaludeční šťávou, kde ve všech vzorcích (s výjimkou spiruliny) byl zaznamenán výrazný pokles zákalu. V porovnání s referenčním vzorkem čisté kultury byla však u vzorků s přidavkem extraktu mladé pšenice a mladého ječmene zaznamenána podpora růstu buněk. Po trávení a následné 24hodinové kultivaci při 37°C byl zaznamenán velký nárůst kultury u vzorku spiruliny a mladé pšenice. K menší podpoře viability došlo také u vzorku moringy a mladého ječmene.

Tabulka 25: Koncentrace buněk kultury *Bifidobacterium breve* před trávením

Před trávením	Počet buněk [CFU/ml]			Viabilita [%]
	<i>Bifidobacterium breve</i>	$3,38 \cdot 10^8$	Živé	
Mrtvé			$2,26 \cdot 10^7$	7

V Tabulce 25 jsou uvedeny počty buněk *B. breve* před modelovým trávením naměřené na průtokovém cytometru. Tyto hodnoty sloužily jako reference pro zhodnocení průběhu trávení.

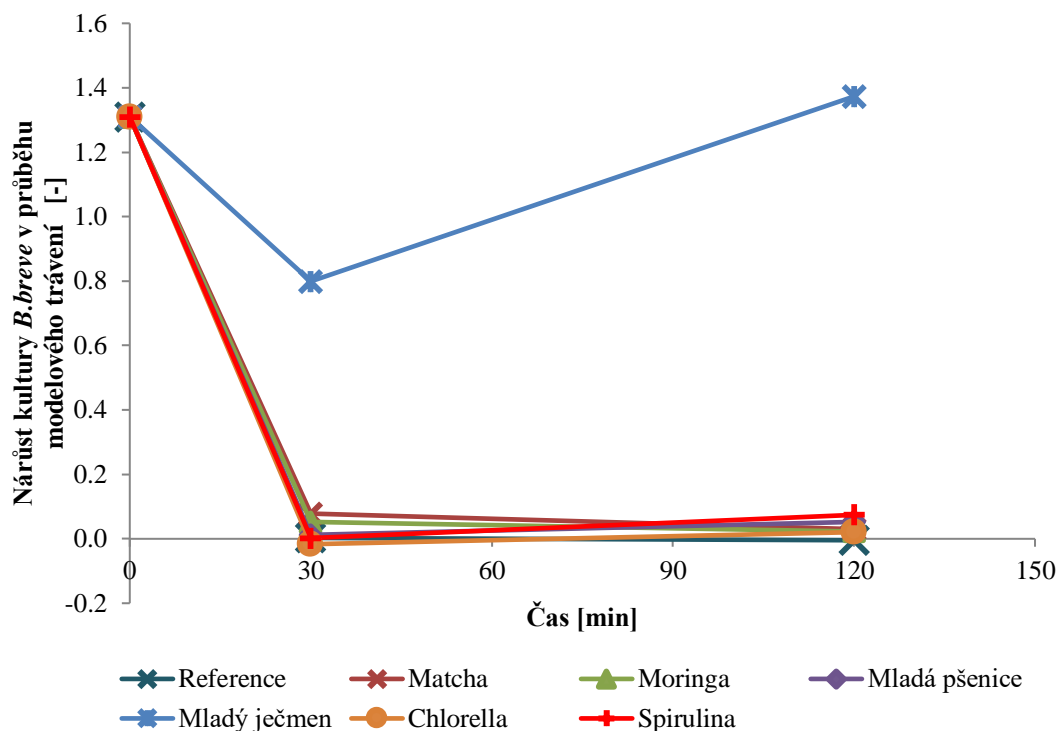
Tabulka 26: Ovlivnění růstu *Bifidobacterium breve* s prebiotiky po modelovém trávení a po 24hodinové kultivaci

Vzorek	Po trávení		Po trávení a 24hodinové kultivaci	
	Počet buněk [CFU/ml]	Viabilita [%]	Počet buněk po 24 hodinách [CFU/ml]	Viabilita [%]
Reference	$8,38 \cdot 10^8$	1	$1,59 \cdot 10^7$	7
Mladý ječmen	$8,48 \cdot 10^8$	15	$4,30 \cdot 10^8$	85
Spirulina	$1,13 \cdot 10^9$	25	$3,12 \cdot 10^8$	80

Z Tabulky 26 vyplývá, že po modelovém trávení kultury *B. breve* bez přídavku prebiotika došlo k usmrcení 99 % buněčné kultury. Po následné 24hodinové kultivaci došlo ke zvýšení viability živých buněk na 7 %. U kombinace probiotika s mladým ječmenem nebo spirulinou došlo v průběhu trávení k ochraně bakteriálních buněk. Životaschopnost živých buněk u těchto extraktů byla v průměru 20 %. Po kultivaci došlo k podpoření růstu a zvýšení viability buněk, která se pohybovala v rozmezí od 80 do 85 %. Ostatní rostlinné materiály jako matcha, moringa, mladá pšenice a chlorella při působení trávicích šťáv neprokázaly ochranný efekt a všechny buňky se po proměření na průtokovém cytometru jeví jako mrtvé.

5.4 Modelové trávení směsí probiotických buněk s reálnými práškovými vzorky

Modelové trávení s přídavkem práškových vzorků bylo pro porovnání provedeno pouze v kombinaci s kmenem *Bifidobacterium breve*. V tomto případě bylo pozorováno to, jaký vliv bude mít přídavek reálného vzorku na probiotické buňky v procesu modelového trávení, a zda dojde k větší ochraně buněk v porovnání s přídavkem rostlinného extraktu.



Obrázek 14: Průběh modelového trávení *Bifidobacterium breve* s reálnými vzorky

Průběh modelového trávení probiotické bakterie *Bifidobacterium breve* s přidavkem práškových vzorků je znázorněn na Obrázku 14. Před trávením byla koncentrace buněk ve všech vzorcích stejná ($8,78 \cdot 10^9$ CFU/ml), proto všechny křivky viability vychází v čase 0 z jednoho bodu. Po 30 minutách byl v porovnání s referenčním vzorkem zaznamenán nárůst probiotické kultury u vzorku s přidavkem matchy, moringy, mladé pšenice a mladého ječmene. Po trávení a následné 24hodinové kultivaci byl ve všech vzorcích pozorován nárůst kultury ve formě buněčného zákalu.

Tabulka 27: Koncentrace buněk kultury *Bifidobacterium breve* před trávením

Před trávením	Počet buněk [CFU/ml]		Viabilita [%]
	<i>Bifidobacterium breve</i>	Živé	
Mrtvé		$1,14 \cdot 10^9$	13

V Tabulce 27 jsou uvedeny počty buněk *B. breve* před modelovým trávením naměřené na průtokovém cytometru. Tyto hodnoty sloužily jako reference pro zhodnocení průběhu trávení.

Tabulka 28: Ovlivnění růstu *Bifidobacterium breve* s přidavkem práškových vzorků po modelovém trávení

Vzorek	Po trávení	
	Počet buněk [CFU/ml]	Viabilita [%]
Reference	$1,78 \cdot 10^9$	2
Matcha	$2,91 \cdot 10^8$	8
Spirulina	$2,02 \cdot 10^8$	4

Z Tabulky 28 vyplývá, že po modelovém trávení kultury *B. breve* bez přidavku prebiotika došlo k usmrcení 98 % buněčné kultury. V případě přidavku reálných prášku došlo při trávení k mírné podpoře viability. U vzorku s práškem matchy životaschopnost živých buněk činila 8 %. U vzorku s práškem spiruliny byla viabilita ještě menší, a to 4 %. Ostatní rostlinné prášky jako moringa, mladá pšenice, mladý ječmen a chlorella neprokázaly v procesu trávení ochranný efekt na bakteriální kulturu a bezprostředně po trávení nebyly životaschopné.

Nejlepší účinek z hlediska ochrany a podpory viability buněčných kultur vykazoval přidavek rostlinných extraktů v porovnání s rostlinnými práškovými vzorky. Po trávení směsi s přidavkem spiruliny byla životaschopnost živých buněk 20 %. Naproti tomu u práškového vzorku činila viabilita pouze 4 %. To mohlo být způsobeno tím, že v těchto směsích oproti extraktům nebyly aktivní látky rozpuštěny ve vodě a pro bakterie tak mohlo být mnohem obtížnější využívat je ke svému růstu.

5.5 Antioxidační aktivita směsí probiotických buněk s rostlinnými extrakty po trávení

Ve směsích probiotických bakterií s rostlinnými extrakty byla stanovena antioxidační aktivita podle postupu v kapitole 4.7.4. Ve směsích před trávením i po trávení byla sledována změna antioxidační aktivity.

Tabulka 29: Antioxidační aktivita směsí probiotických bakterií s rostlinnými extrakty před a po trávení

Vzorky	Koncentrace [mg/g]			
	Před trávením	Po trávení		
		<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>
Matcha	2,59 ± 0,00	0,59 ± 0,00	0,58 ± 0,00	0,58 ± 0,00
Moringa	1,95 ± 0,05	0,39 ± 0,00	0,35 ± 0,00	0,52 ± 0,01
Mladá pšenice	1,46 ± 0,01	0,20 ± 0,00	0,29 ± 0,00	0,33 ± 0,01
Mladý ječmen	1,27 ± 0,03	0,23 ± 0,00	0,23 ± 0,00	0,26 ± 0,00
Chlorella	1,51 ± 0,01	0,54 ± 0,01	0,27 ± 0,00	0,25 ± 0,00
Spirulina	1,59 ± 0,05	0,41 ± 0,00	0,47 ± 0,00	0,49 ± 0,00

V Tabulce 29 můžeme vidět, že všechny vzorky před trávením vykazovaly velkou antioxidační aktivitu. V procesu modelového trávení došlo u všech směsí k poklesu antioxidační aktivity vlivem působení trávicích šťáv, což bylo pozorováno i změnou barvy vzorků.

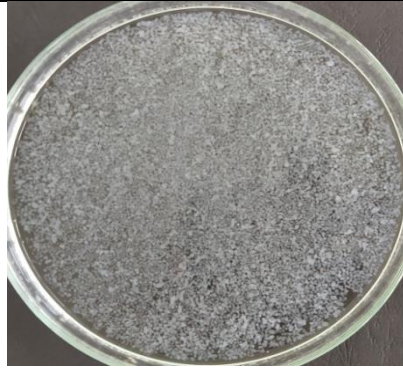

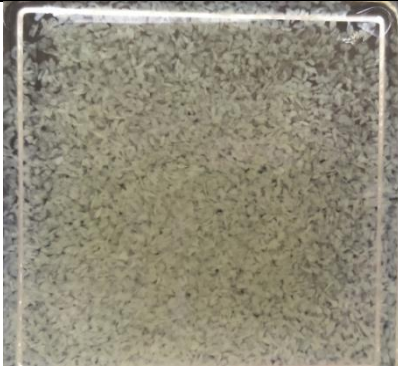

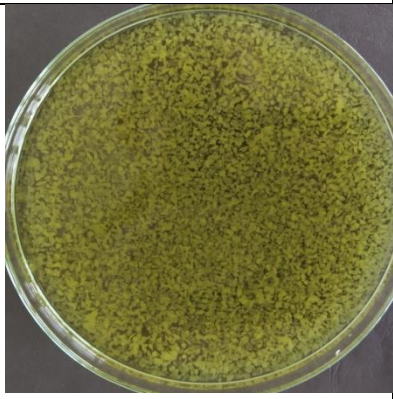

5.6 Výběr vhodných kombinací probiotik a prebiotik pro přípravu alginátových částic

Alginátové částice a lyofilizované alginátové částice o velikosti 450 µm a 1 000 µm byly vytvořeny pomocí enkapsulátoru podle postupu uvedeného v kapitole 4.12 a 4.13. K enkapsulaci byly využity 3 bakteriální kmeny, které byly následně smíchány s vybranými prebiotiky. Kombinace probiotické kultury s rostlinným extraktem byla zvolena na základě výsledků jejich interakce provedené v kapitole 5.2. Alginátové částice o velikosti 450 µm byly připraveny z prebiotik, které podpořily nárůst buněčné kultury. Větší částice o velikosti 1 000 µm byly připraveny z těch prebiotik, kde byl zaznamenán největší nárůst buněk. Seznam alginátových částic je uveden v Tabulce 30. Ukázka některých těchto alginátových nelyofilizovaných částic je uvedena v Tabulce 31. Jako reference sloužily částice o velikosti 450 µm a 1 000 µm se samotnou bakteriální kulturou.

Tabulka 30: Přehled připravených alginátových částic

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>
450 µm LA	450 µm LC	450 µm BB
1 000 µm LA	1 000 µm LC	1 000 µm BB
450 µm LA + ječmen	450 µm LC + ječmen	450 µm BB + matcha
1 000 µm LA + ječmen	1 000 µm LC + ječmen	450 µm BB + chlorella
450 µm LA + matcha	450 µm LC + pšenice	
450 µm LA + moringa	1 000 µm LC + pšenice	

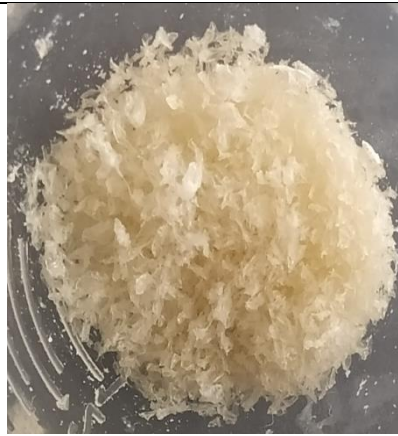
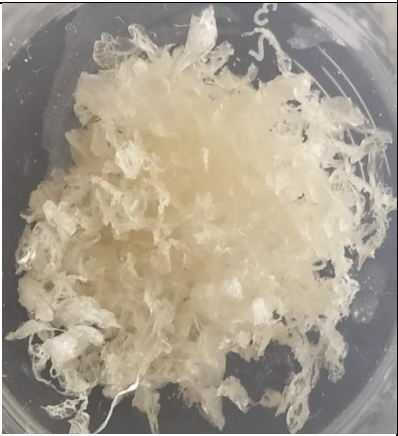




Tabulka 31: Ukázka některých připravených alginátových částic

Alginátové částice		
<i>B. breve</i> 450 µm	<i>B. breve</i> 1 000 µm	<i>B. breve</i> + chlorella 450 µm
		
<i>L. casei</i> + mladá pšenice 1 000 µm	<i>L. acidophilus</i> + matcha 450 µm	<i>L. acidophilus</i> + mladý ječmen 450 µm
		

Na základě interakce probiotik s rostlinnými extrakty podle kapitoly 5.2 bylo zjištěno, že extrakt moringy vykazoval dobré vlastnosti a podporoval růst probiotické kultury ve všech třech vybraných kmenech. Při přípravě směsi pro enkapsulaci se však po přidavku extraktu moringy do alginátu vytvořily sraženiny. Podle literární rešerše bylo zjištěno, že moringa se využívá mimo jiné také k čištění vody. Je schopna na sebe vázat prachové částice, které se následně usazují na dně. Existují i studie, které uvádí, že tímto způsobem je možné z vody odstranit až 99 % bakterií [21]. Z vysrážené směsi moringy s kmenem *Lactobacillus acidophilus* se pomocí enkapsulátoru podařilo vyrobit dostatečné množství částic nutných pro následnou analýzu. Jelikož při tvorbě částic docházelo vlivem sraženin k ucpávání enkapsulátoru, byly částice připraveny jen v jedné velikosti (450 µm) pro jeden kmen (*L. acidophilus*).

Alginátové částice byly následně sušeny mrazem metodou lyofilizace. Ukázka lyofilizovaných alginátových částic je uvedena v Tabulce 32.

Tabulka 32: Ukázka některých připravených lyofilizovaných alginátových částic

Lyofilizované alginátové částice		
<i>B. breve</i> 450 μm	<i>B. breve</i> 1 000 μm	<i>B. breve</i> + chlorella 450 μm
		
<i>L. casei</i> + mladá pšenice 1 000 μm	<i>L. acidophilus</i> + matcha 450 μm	<i>L. acidophilus</i> + mladý ječmen 450 μm
		

Připravené alginátové částice byly sledovány pod optickým mikroskopem. Vzhled a změna tvaru alginátových částic je zobrazena v Příloze 4. Vrstvy alginátových částic byly průhledné. Po přidavku bakteriálních kultur byly částice na pohled zrnitější a v částicích bylo následně možné pozorovat tyčinky probiotických bakterií.

5.7 Charakterizace alginátových částic

U alginátových částic byla stanovena enkapsulační účinnost a byla také sledována jejich stabilita při průchodu modelovým trávicím traktem.

5.7.1 Stanovení enkapsulační účinnosti

Enkapsulační účinnost byla stanovena na základě postupu uvedeného v kapitole 4.14.1. V jednotlivých směsích připravených pro enkapsulaci a ve vytvrzovacích roztocích po zfiltrování hotových částic byly stanoveny koncentrace celkových polyfenolů. Z rozdílů těchto hodnot byla vypočítána enkapsulační účinnost, která byla vyjádřena v procentech. Každý vzorek byl analyzován třikrát a ze získaných hodnot byl vypočten průměr i směrodatná odchylka.

Tabulka 33: Enkapsulační účinnost alginátových částic

Alginátové částice	Enkapsulační účinnost [%]
<i>L. acidophilus</i> + ječmen 450 μm	28,7 \pm 1,2
<i>L. acidophilus</i> + ječmen 1 000 μm	34,5 \pm 1,8
<i>L. acidophilus</i> + matcha 450 μm	40,4 \pm 1,8
<i>L. acidophilus</i> + moringa 450 μm	66,8 \pm 0,7
<i>L. casei</i> + ječmen 450 μm	32,1 \pm 2,9
<i>L. casei</i> + ječmen 1 000 μm	38,3 \pm 1,0
<i>L. casei</i> + pšenice 450 μm	58,6 \pm 1,7
<i>L. casei</i> + pšenice 1 000 μm	46,4 \pm 2,2
<i>B. breve</i> + matcha 450 μm	52,6 \pm 1,0
<i>B. breve</i> + chlorella 450 μm	48,4 \pm 1,5

Z výsledků je patrné, že enkapsulační účinnosti nad 50 % bylo dosaženo u tří typů alginátových částic připravených kombinací *L. acidophilus* a extraktu z moringy (66,8 %), *L. casei* a extraktu z pšenice (58,6 %) a *B. breve* s extraktem z matchy (52,6 %).

U částic s enkapsulovaným extraktem z moringy mohla být vyšší účinnost enkapsulace způsobena předchozím vysrážením směsi určené pro přípravu částic. Nejnižší enkapsulační účinnost byla naměřena u menších částic v případě koenkapsulace *L. acidophilus* s extraktem z matchy, a to 28,7 %.

5.7.2 Stabilita připravených částic

V další části byl sledován vliv enkapsulace a lyofilizace na viabilitu testovaných probiotických bakterií při průchodu částic simulovanými podmínkami lidského trávení.

5.7.2.1 Modelové trávení alginátových částic

Modelové trávení alginátových částic s enkapsulovanými probiotickými bakteriemi a rostlinnými extrakty bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 4.15.3.1.

Tabulka 34: Nárůst kultury ve formě buněčného zákalu v průběhu trávení

Alginátové částice	Měření zákalu $\Delta A [-]$
<i>L. acidophilus</i> 450 μm	$1,097 \pm 0,028$
<i>L. acidophilus</i> 1 000 μm	$0,625 \pm 0,096$
<i>L. acidophilus</i> + ječmen 450 μm	$1,272 \pm 0,078$
<i>L. acidophilus</i> + ječmen 1 000 μm	$1,269 \pm 0,044$
<i>L. acidophilus</i> + matcha 450 μm	$1,443 \pm 0,062$
<i>L. acidophilus</i> + moringa 450 μm	$1,312 \pm 0,078$
<i>L. casei</i> 450 μm	$1,365 \pm 0,167$
<i>L. casei</i> 1 000 μm	$1,374 \pm 0,252$
<i>L. casei</i> + ječmen 450 μm	$1,206 \pm 0,563$
<i>L. casei</i> + ječmen 1 000 μm	$0,116 \pm 0,059$
<i>L. casei</i> + pšenice 450 μm	$1,127 \pm 0,401$
<i>L. casei</i> + pšenice 1 000 μm	$0,076 \pm 0,002$
<i>B. breve</i> 450 μm	$1,003 \pm 0,177$
<i>B. breve</i> 1 000 μm	$1,397 \pm 0,051$
<i>B. breve</i> + matcha 450 μm	$0,111 \pm 0,028$
<i>B. breve</i> + chlorella 450 μm	$0,093 \pm 0,002$

Z Tabulky 34 můžeme vyčíst, že porovnáním alginátových částic jen s probiotickými buňkami a alginátových částic s probiotickými buňkami i enkapsulovanými extrakty došlo po trávení k nárůstu kultury pouze u částic obsahujících kmen *Lactobacillus acidophilus*. U kmenů *Lactobacillus casei* a *Bifidobacterium breve* nedošlo oproti referenci k dostatečnému nárůstu buněk a tím ani k velké tvorbě zákalu.

Tabulka 35: Počáteční koncentrace probiotických buněk před trávením

Probiotická kultura	Počet buněk [CFU/ml]	Viabilita [%]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	$5,32 \cdot 10^7$	73
<i>Lactobacillus casei</i>	$2,84 \cdot 10^8$	77
<i>Bifidobacterium breve</i>	$2,48 \cdot 10^7$	74

Tabulka 36: Vliv enkapsulace na růst probiotických kultur po modelovém trávení

Alginátové částice		Po trávení a 24hodinové kultivaci	
Probiotická kultura	Prebiotikum	Počet buněk po 24 hodinách [CFU/ml]	Viabilita [%]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Buňky 450 μm	$2,59 \cdot 10^8$	76
	Buňky 1 000 μm	$2,14 \cdot 10^8$	82
	Mladý ječmen 450 μm	$2,08 \cdot 10^8$	76
	Mladý ječmen 1 000 μm	$2,47 \cdot 10^8$	89
	Matcha 450 μm	$2,95 \cdot 10^8$	84
	Moringa 450 μm	$2,89 \cdot 10^8$	84
<i>Lactobacillus casei</i>	Buňky 450 μm	$1,67 \cdot 10^8$	80
	Buňky 1 000 μm	$3,16 \cdot 10^8$	75
	Mladý ječmen 450 μm	$2,20 \cdot 10^8$	81
	Mladý ječmen 1 000 μm	$2,80 \cdot 10^4$	19
	Mladá pšenice 450 μm	$1,16 \cdot 10^5$	20
	Mladá pšenice 1 000 μm	$2,17 \cdot 10^6$	20
<i>Bifidobacterium breve</i>	Buňky 450 μm	$2,50 \cdot 10^8$	78
	Buňky 1 000 μm	$2,71 \cdot 10^8$	76
	Matcha 450 μm	$2,60 \cdot 10^6$	92
	Chlorella 450 μm	$2,40 \cdot 10^5$	36

V Tabulce 36 jsou uvedeny počty buněk a hodnoty viability naměřené na průtokovém cytometru po 24hodinové kultivaci. U částic obsahujících kmen *Lactobacillus acidophilus* vidíme, že enkapsulované probiotické bakterie byly schopné v částicích přežít i v průběhu modelového trávení. Probiotické bakterie si zachovaly svoji životaschopnost a jejich viabilita se po následné kultivaci pohybovala v rozmezí od 76 do 89 %. Dále můžeme vidět, že v porovnání s referenčními částicemi enkapsulovaných bakterií došlo vlivem přidavku rostlinných extraktů ke zvýšení počtu buněk, a to téměř ve všech částicích. Výjimkou byly malé částice s přidavkem mladého ječmene, kde nedošlo k významnému navýšení počtu buněk.

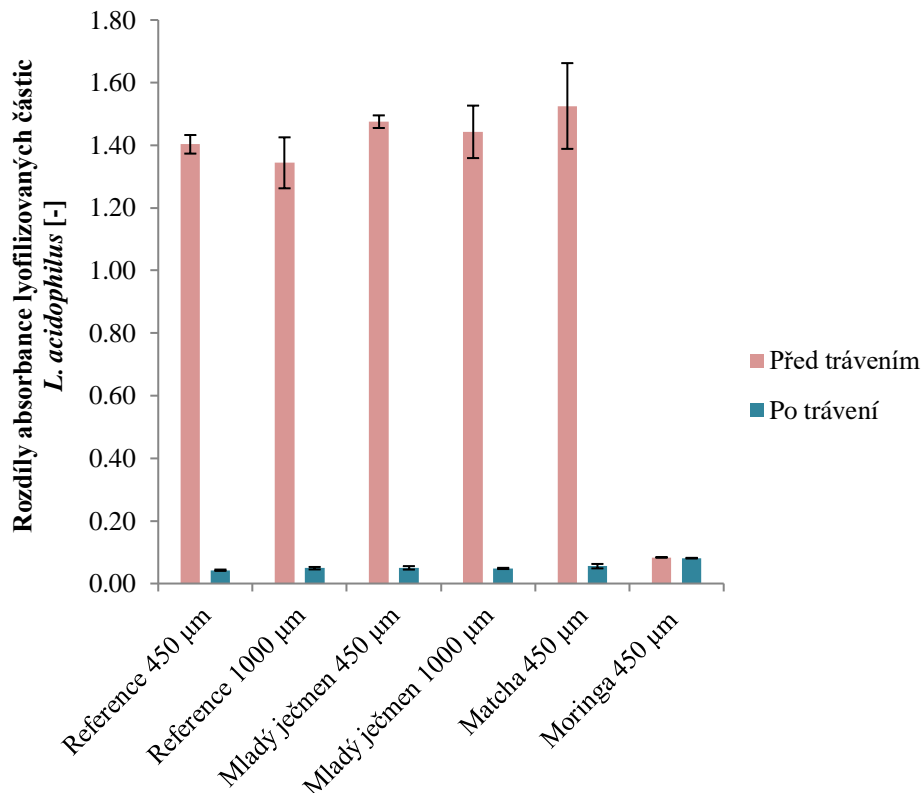
Referenční částice s enkapsulovaným kmenem *Lactobacillus casei* a malé částice s přidavkem mladého ječmene vykazovaly po trávení vysokou viabilitu živých probiotických buněk, a to v průměru 79 %. Extrakt ječmene navíc ještě podpořil nárůst počtu probiotických buněk. Naopak u částic s přidavkem mladé pšenice a velkých částic s ječmenem byla po trávení naměřena velmi nízká viabilita buněk, která činila pouze 20 %. Současně byl u vzorků naměřen i nízký počet buněk. U velkých enkapsulovaných částic s ječmenem se

jednalo o pokles počtu buněk až o 4 řády. Z toho můžeme usoudit, že vlivem modelového trávení nedošlo k uvolnění všech probiotických buněk a část zůstala ještě v enkapsulované formě chráněná vrstvou alginátu. Současně mohlo dojít i k částečné inhibici růstu. To bylo také potvrzeno u trávení neenkapsulovaných probiotik a prebiotik (kapitola 5.3.2), kde však oproti referenčním vzorkům nedocházelo k výrazné inhibici.

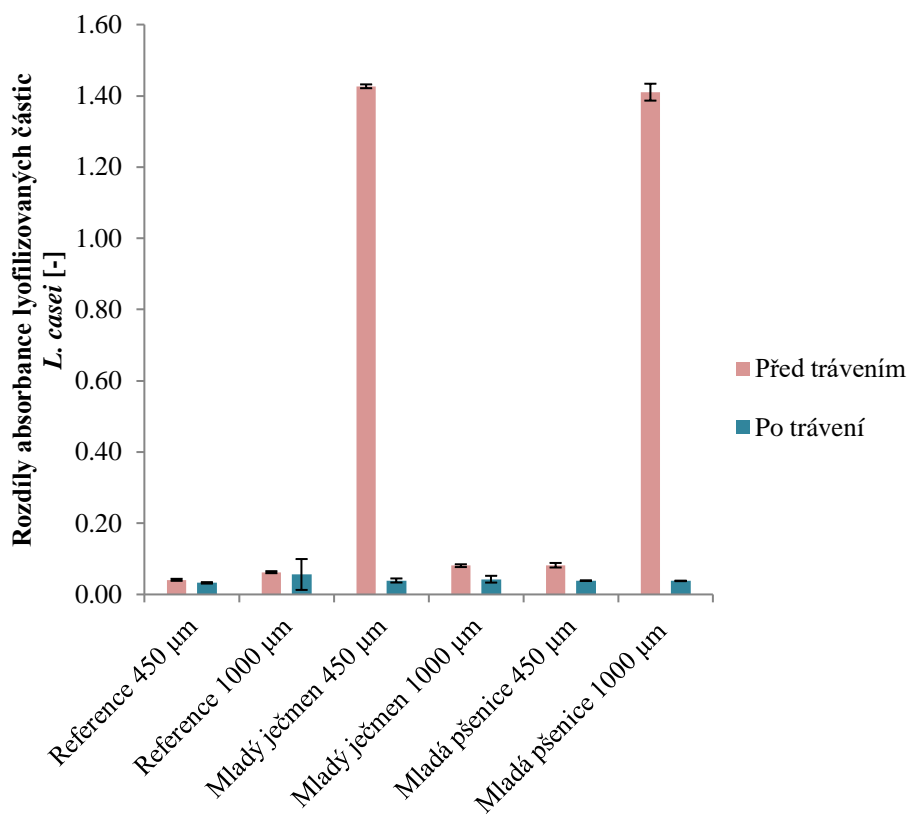
U alginátových částic obsahujících kmen *Bifidobacterium breve* byl pozorován podobný trend. Čistá probiotická kultura bez přídavku prebiotik byla v procesu modelového trávení ochráněna před působením trávicích šťáv a následně uvolněna z částic. Probiotické bakterie vykazovaly vysokou viabilitu (v průměru 77 %) i počet buněk. U částic s koenkapsulovanými rostlinnými extrakty byl stanoven nízký počet probiotických buněk. Zde můžeme opět předpokládat, že nedošlo k uvolnění všech buněk z částic. Částice s obsahem matchy navíc oproti částicím s chlorelou měly mnohem vyšší viabilitu živých buněk, a to 92 %.

5.7.2.2 Modelové trávení lyofilizovaných alginátových částic

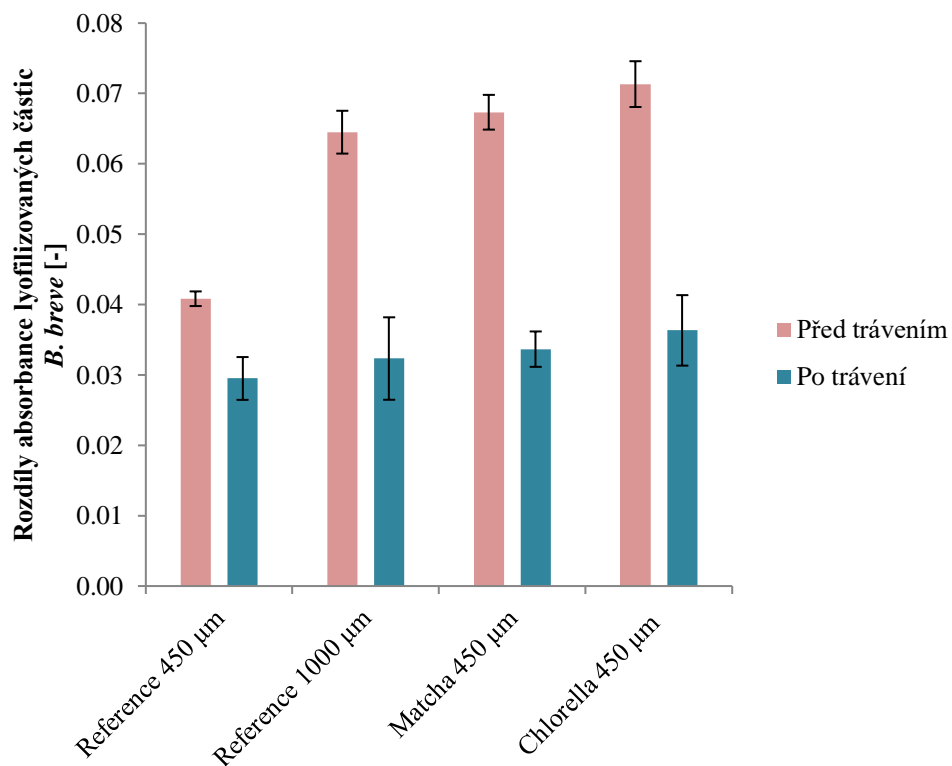
Modelové trávení lyofilizovaných alginátových částic bylo provedeno podle postupu uvedeného v kapitole 4.15.3.2. Pro lepší znázornění průběhu modelového trávení byly sestrojeny následující grafy.



Obrázek 15: Průběh modelového trávení lyofilizovaných částic s *L. acidophilus*



Obrázek 16: Průběh modelového trávení lyofilizovaných částic *L. casei*



Obrázek 17: Průběh modelového trávení lyofilizovaných částic s *B. breve*

Tabulka 37: Nárůst kultury ve formě buněčného zákalu u lyofilizovaných částic před a po trávení

Lyofilizované alginátové částice	Měření zákalu ΔA [-]	
	Před trávením	Po trávení
<i>L. acidophilus</i> 450 μm	1,403 \pm 0,030	0,043 \pm 0,002
<i>L. acidophilus</i> 1 000 μm	1,344 \pm 0,081	0,049 \pm 0,004
<i>L. acidophilus</i> + ječmen 450 μm	1,475 \pm 0,020	0,050 \pm 0,006
<i>L. acidophilus</i> + ječmen 1 000 μm	1,443 \pm 0,084	0,048 \pm 0,002
<i>L. acidophilus</i> + matcha 450 μm	1,525 \pm 0,137	0,056 \pm 0,007
<i>L. acidophilus</i> + moringa 450 μm	0,084 \pm 0,000	0,081 \pm 0,001
<i>L. casei</i> 450 μm	0,041 \pm 0,003	0,033 \pm 0,002
<i>L. casei</i> 1 000 μm	0,063 \pm 0,003	0,056 \pm 0,043
<i>L. casei</i> + ječmen 450 μm	1,427 \pm 0,005	0,039 \pm 0,006
<i>L. casei</i> + ječmen 1 000 μm	0,081 \pm 0,004	0,043 \pm 0,010
<i>L. casei</i> + pšenice 450 μm	0,082 \pm 0,006	0,039 \pm 0,001
<i>L. casei</i> + pšenice 1 000 μm	1,410 \pm 0,024	0,038 \pm 0,001
<i>B. breve</i> 450 μm	0,041 \pm 0,001	0,030 \pm 0,003
<i>B. breve</i> 1 000 μm	0,065 \pm 0,003	0,032 \pm 0,006
<i>B. breve</i> + matcha 450 μm	0,067 \pm 0,002	0,034 \pm 0,003
<i>B. breve</i> + chlorella 450 μm	0,071 \pm 0,003	0,036 \pm 0,005

Z Tabulky 37 a přiložených sloupcových grafů (obrázek 15–17) zobrazujících průběh modelového trávení můžeme vidět, že vlivem rehydratace došlo téměř u všech lyofilizovaných částic s extrakty k nárůstu probiotické kultury. Jedinou výjimkou byly částice obsahující extrakt z moringy, kde podle grafu na Obrázku 15 došlo oproti referenci k výrazné inhibici. Po trávení došlo ke zpomalení růstu probiotické kultury pouze u velkých alginátových částic s enkapsulovanými extrakty mladé pšenice a mladého ječmene. U ostatních částic došlo k podpoření růstu kultury.

Tabulka 38: Vliv lyofilizace částic na růst probiotických kultur po modelovém trávení

Lyofilizované alginátové částice		Po trávení a 24hodinové kultivaci	
Probiotická kultura	Prebiotikum	Počet buněk po 24 hodinách [CFU/ml]	Viabilita [%]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Buňky 450 μm	2,41 \cdot 10 ⁵	42
	Buňky 1 000 μm	7,33 \cdot 10 ⁴	58
	Mladý ječmen 450 μm	9,08 \cdot 10 ⁴	54
	Mladý ječmen 1 000 μm	1,01 \cdot 10 ⁵	64
	Matcha 450 μm	1,23 \cdot 10 ⁵	74
	Moringa 450 μm	Nedetekováno	

Pro modelové trávení lyofilizovaných částic s enkapsulovanými probiotiky i prebiotiky byly vybrány částice obsahující kmen *L. acidophilus*. Po modelovém trávení a následné 24hodinové kultivaci byly u lyofilizovaných částic na průtokovém cytometru stanoveny velmi nízké počty probiotických buněk, jejichž koncentrace se pohybovaly ve čtvrtém a pátém řádu. To mohlo být způsobeno pravděpodobně nedostatečnou rehydratací lyofilizovaných buněk. Vzorek moringy nebyl detekován z důvodu technických problémů při aplikaci tohoto vzorku na průtokový cytometr.

5.8 Charakterizace komerčních probiotických doplňků stravy

Vybrané dětské doplňky stravy obsahující různé kombinace probiotických kmenů byly charakterizovány z hlediska počtu buněk a jejich životaschopnosti. Probiotické přípravky byly dále podrobeny modelovému trávení.

5.8.1 Kontrola deklarovaného množství buněk v komerčních doplňcích stravy

U komerčních probiotických přípravků byla nejprve provedena kontrola počtu životaschopných buněk pomocí průtokového cytometru podle postupu uvedeného v kapitole 4.9.2. Naměřené počty buněk byly následně porovnány s deklarovanými hodnotami uvedenými na etiketách přípravků.

Před měřením byly buňky rozsuspendovány ve sterilní destilované vodě. Část těchto buněk byla dále kultivována po dobu 24 hodin v tekutém MRS médiu. Viabilita probiotických přípravků byla sledována na průtokovém cytometru u vzorků před i po kultivaci. Pro testování probiotických doplňků stravy byly vybrány komerční přípravky Osmobiotic Flora Baby ve formě kapek a Laktobacílky Baby ve formě prášku.

Tabulka 39: Porovnání naměřeného a deklarovaného množství buněk v komerčních přípravcích

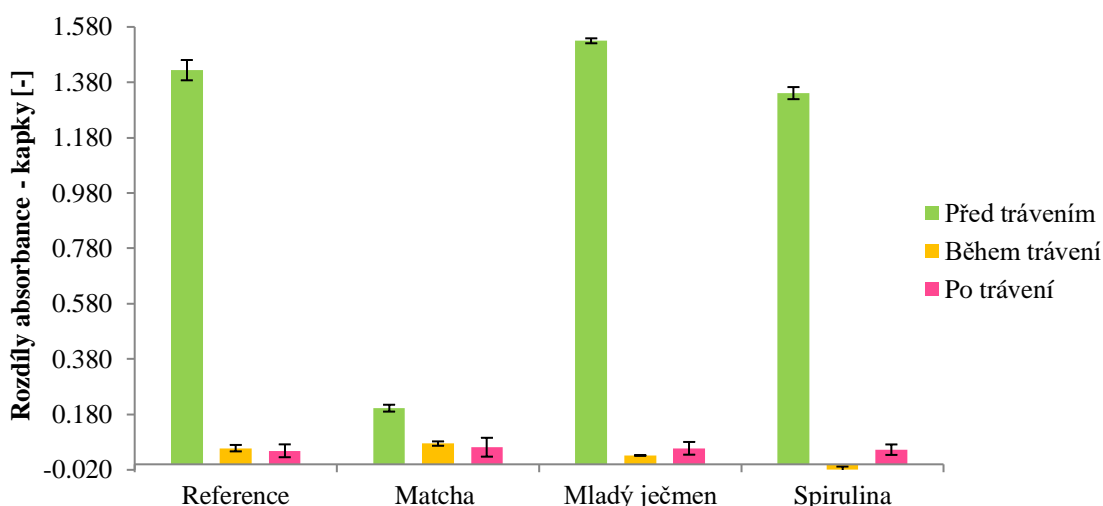
Probiotický doplňek stravy	Naměřené množství buněk		Deklarované množství buněk [CFU/ml]
	Počet buněk [CFU/ml]	Počet buněk po 24hodinové kultivaci [CFU/ml]	
Kapky	$1,6 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^9$	$5,0 \cdot 10^8$
Prášek	$1,5 \cdot 10^8$	$8,8 \cdot 10^8$	$1,0 \cdot 10^9$

Na základě naměřených dat můžeme konstatovat, že deklarované množství buněk bylo potvrzeno po 24hodinové kultivaci u probiotického přípravku ve formě kapek. Zde bylo dokonce dosaženo většího množství buněk, než jaké bylo deklarováno výrobcem. Naopak u práškového preparátu nebylo ani po kultivaci dosaženo deklarovaného množství. Naměřené

hodnoty však byly velmi podobné. Dále můžeme říci, že v průběhu kultivace došlo u kapek k velkému nárůstu kultury. K výraznému nárůstu počtu buněk během kultivace však nedošlo u přípravku ve formě prášku. Jednalo se o lyofilizovaný preparát obsahující 5 probiotických kultur, jejichž pomalejší nárůst kultury mohla způsobit delší lag fáze přítomných bakteriálních kmenů. Většího množství buněk by bylo možné docílit delší dobou kultivace.

5.8.2 Modelové trávení vybraných komerčních probiotických preparátů

Dětské probiotické doplňky stravy byly dále obohaceny o rostlinný extrakt matchy, mladého ječmene a spiruliny a následně podrobeny působení modelových trávicích šťáv. Tyto rostlinné materiály byly vybrány na základě vlivu jejich extraktů na viabilitu probiotických buněk v kapitole 5.2. Referenčním vzorkem byl v tomto případě probiotický preparát bez přídavku prebiotického extraktu. Modelové trávení komerčních preparátů bylo provedeno podle návodu v kapitole 4.15.4. U probiotických přípravků byl po modelovém trávení sledován nárůst bakteriální kultury na ELISA Readeru a také viabilita buněk pomocí průtokového cytometru.



Obrázek 18: Průběh modelového trávení komerčního přípravku – kapek Osmobiotic Flora Baby

Obrázek 18 zobrazuje průběh modelového trávení probiotických kapek prostřednictvím tří odběrů v průběhu trávení. Hodnoty naměřené před trávením zobrazují interakci probiotického preparátu s vybranými extrakty. Můžeme vidět, že růst probiotické kultury byl podpořen přidavkem extraktu z ječmene. Matcha naopak způsobila inhibici kultury. Dále můžeme vidět, že po trávení došlo ve všech případech k nárůstu probiotické kultury měřené z rozdílu zákalu. V porovnání s Tabulkou 40 ale můžeme vidět, že bezprostředně po trávení došlo k nárůstu počtu buněk, kde převládaly buňky mrtvé. To značí i viabilita, která poklesla z 85 % na pouhých 31 %.

Tabulka 40: Počet buněk před a po modelovém trávení pro kapky bez přídavku prebiotika

Vzorek	Před trávením		Po trávení	
	Počet buněk [CFU/ml]	Viabilita [%]	Počet buněk [CFU/ml]	Viabilita [%]
Kapky	$1,82 \cdot 10^6$	85	$4,48 \cdot 10^6$	31

Koncentrace buněk ve směsi po trávení částic je vyšší, jelikož se bakteriální buňky v kapkách nacházely v enkapsulované formě. Tyto enkapsulované částice s probiotiky se během trávení narušily, čímž došlo k uvolnění probiotik do roztoku. Probiotické bakterie působením trávicích šťáv ztratily svoji viabilitu a převládaly buňky mrtvé. Vzorky před kultivací ukazují viabilitu buněk bezprostředně po trávení a před trávením.

Tabulka 41: Počet buněk po trávení a 24hodinové kultivaci pro kapky s přídavkem prebiotik

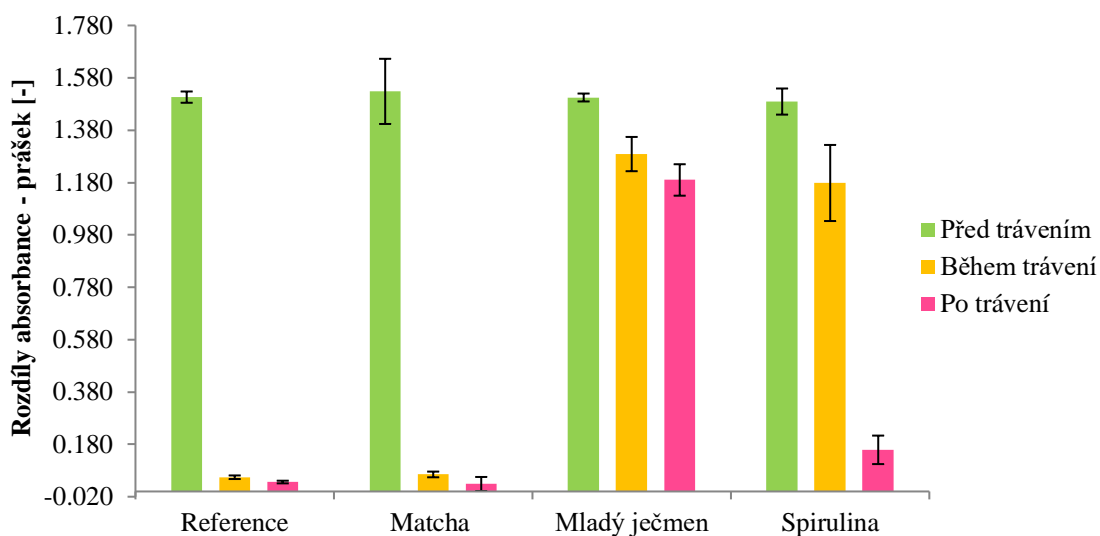
Kapky	Po trávení	
	Počet buněk [CFU/ml]	Viabilita [%]
Reference	$9,28 \cdot 10^5$	53
Matcha	$2,01 \cdot 10^5$	78
Mladý ječmen	$3,99 \cdot 10^5$	39
Spirulina	$5,04 \cdot 10^5$	53

V Tabulce 41 můžeme vidět, že v průběhu trávení probiotik ve formě kapek nedošlo vlivem přídavku extraktu k podpoření nárůstu kultury.

Kapky obsahují kombinaci probiotických kmenů *L. casei* a *B. breve*. Z interakce probiotických bakterií s rostlinnými materiály v kapitole 4.10. bylo zjištěno, že přídavkem mladého ječmene a spiruliny k oběma probiotickým kmenům došlo při trávení k ochraně bakteriální kultury. Následnou kultivací došlo ke zvýšení počtu buněk.

Extrakty se tedy nedostaly do kontaktu s komerčními probiotiky, protože probiotické kultury v kapkách byly stabilizovány do částic pomocí mikroenkapsulace. U toho komerčního preparátu nedošlo k ochraně buněk vlivem extraktu, což se projevilo poklesem viability. U matchy došlo k poklesu počtu buněk, ale zvýšila se viabilita.

Dalším testovaným probiotickým doplňkem stravy byl práškový preparát.



Obrázek 19: Průběh modelového trávení komerčního přípravku – prášku Laktobacílky Baby

Průběh modelového trávení probiotického prášku zobrazuje Obrázek 19. Z interakce práškového probiotika s přidavkem vybraných prebiotik můžeme pozorovat, že u žádného vzorku nedošlo k výrazné inhibici probiotické kultury. Ve vzorcích bylo pozorováno pouze zpomalení růstu kultury. Po modelovém trávení byl největší nárůst bakteriální kultury zaznamenán u kombinace práškového probiotika s extraktem z mladého ječmene. Toto měření bylo následně ověřeno na průtokovém cytometru.

Tabulka 42: Počet buněk před a po modelovém trávení pro prášek bez přidavku prebiotika

Vzorek	Před trávením		Po trávení	
	Počet buněk [CFU/ml]	Viabilita [%]	Počet buněk [CFU/ml]	Viabilita [%]
Prášek	$8,52 \cdot 10^7$	18	$3,94 \cdot 10^6$	33

U práškového přípravku obsahujícího lyofilizované probiotické buňky bylo před trávením zjištěno, že i po rehydrataci byla viabilita buněk nízká (18 %) a ve směsi tedy převládaly buňky mrtvé. Vlivem trávení došlo u komerčního probiotika ve formě prášku ke snížení počtu buněk, kde stále převládaly mrtvé buňky.

Tabulka 43: Počet buněk po trávení a 24hodinové kultivaci pro prášek s přidavkem prebiotik

Prášek	Po trávení	
	Počet buněk [CFU/ml]	Viabilita [%]
Reference	$4,82 \cdot 10^5$	82
Matcha	$2,15 \cdot 10^5$	89
Mladý ječmen	$2,22 \cdot 10^8$	97
Spirulina	$3,42 \cdot 10^6$	10

V Tabulce 43 vidíme, že k ochraně probiotických buněk v práškovém preparátu v průběhu modelového trávení došlo vlivem přidavku extraktu z mladého ječmene. Na průtokovém cytometru byl potvrzen nejvyšší nárůst počtu buněk oproti referenci, a to o 3 řády. Probiotické buňky byly i po trávení a 24hodinové kultivaci živé. Viabilita činila 97 %.

5.9 Shrnutí a výběr nejlepších probiotických a prebiotických složek

Cílem diplomové práce bylo navrhnout a připravit preparát probiotických bakterií obohacených o rostlinná prebiotika a následně stabilizovat tyto směsi do alginátových částic pro možnou aplikaci do dětských výrobků.

Přímou interakcí jednotlivých buněk s rostlinnými extrakty nedošlo u žádného bakteriálního kmene k výrazné inhibici růstu, ale také ani k výraznému nárůstu buněk. Hodnoty viability však byly relativně vysoké a neklesly pod 77 %. Největší nárůst buněk byl však zjištěn u kmene *Lactobacillus acidophilus* v kombinaci s extraktem matchy, moringy a mladého ječmene; u kmene *Lactobacillus casei* v kombinaci s mladým ječmenem a mladou pšenicí. U kmene *Bifidobacterium breve* bylo největšího nárůstu kultury dosaženo po přidavku extraktu z matchy a chlorelly.

Podle výsledků interakce s extrakty byly následně z těchto vybraných kombinací vytvořeny alginátové částice o velikosti 450 μm a 1 000 μm .

Tabulka 44: Shrnutí vlastností alginátových částic po modelovém trávení

Probiotický kmen	Typ částic	Matcha 450 µm	Moringa 450 µm	Mladý ječmen 450 µm	Mladý ječmen 1 000 µm	Mladá pšenice 450 µm	Mladá pšenice 1 000 µm	Chlorella 450 µm
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Nelyofilizované	✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓	✓ ✓	-	-	-
	Lyofilizované	✓	✓	✓	✓	-	-	-
<i>Lactobacillus casei</i>	Nelyofilizované	-	-	✓ ✓	✓	✓	✓	-
	Lyofilizované	-	-	✓	x	✓	x	-
<i>Bifidobacterium breve</i>	Nelyofilizované	✓	-	-	-	-	-	✓
	Lyofilizované	✓	-	-	-	-	-	✓

Vysvětlivky: - neměřeno, x inhibice, ✓ podpora viability, ✓✓ výrazná podpora viability,

Po modelovém trávení byl prokázán ochranný efekt na probiotické buňky vlivem přídavku u všech extraktů s výjimkou chlorelly a matchy. Jelikož extrakty neochránily přímou interakcí probiotické buňky, i přesto byly aplikovány do alginátových částic, kde především v případě kmene *Lactobacillus acidophilus* a *Bifidobacterium breve* byla zaznamenána viabilita buněk i po trávení, a tím i určitý ochranný vliv extraktu i alginátu.

Z nárůstu buněk ve formě zákalu bylo u lyofilizovaných částic s kmenem *L. casei* po trávení zjištěno, že k výraznému nárůstu kultury nedošlo v případě velkých částic s přídavkem mladého ječmene a mladé pšenice. Lze však předpokládat, že po proměření viability na průtokovém cytometru by i přesto bylo zjištěno, že buňky v lyofilizovaných částicích zůstaly v do určité míry stále viabilní. Ostatní kombinace růst bakteriální kultury podpořily.

Lyofilizované částic s enkapsulovaným kmenem *Lactobacillus acidophilus* vykazovaly po sušení i trávení značnou viabilitu a jsou tedy vhodné pro aplikace do potravin.

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na přípravu probiotické složky s přidavkem rostlinných extraktů určených pro dětskou výživu. Testovanými probiotickými kmeny byly *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* a *Bifidobacterium breve*.

V experimentální části práce byla provedena charakteristika rostlinných extraktů z matchy, moringy, mladé pšenice, mladého ječmene, chlorelly a spiruliny. Tyto materiály byly nejprve charakterizovány z hlediska obsahu celkových a redukujících sacharidů. Výsledné hodnoty byly následně porovnány s hodnotami deklarovanými výrobcem. Sacharidy jsou zdrojem živin a energie pro růst probiotických bakterií a z toho důvodu je to důležitý ukazatel pro výběr vhodných prebiotik. Největší množství redukujících sacharidů obsahovala chlorella (4,15 g/100 g) následovaná zeleným ječmenem (3,98 g/100 g) a matchou (3,43 g/100 g). Z hlediska obsahu celkových sacharidů (13,16 g/100 g), polyfenolů (57,0 mg/g) a antioxidační aktivity (28,8 mg/g) byl nejlepším zdrojem čaj matcha. Pomocí HPLC bylo v matche identifikováno 9 fenolických sloučenin a je tak dobrým zdrojem širokého spektra fenolických látek.

Ve druhé části experimentální práce byly testovány jednotlivé probiotické kultury. Rostlinné extrakty byly přidávány do probiotických kultur za účelem možné aplikace těchto směsí do potravy. Z toho důvodu byl nejprve sledován vliv přidavku rostlinných extraktů na viabilitu bakterií. Byl sledován nárůst kultury v podobě změny zákalu, počet buněk a viabilita. Přímou interakcí jednotlivých buněk s rostlinnými extrakty nedošlo u žádného bakteriálního kmene k výrazné inhibici růstu.

Dále byly směsi probiotických kultur s rostlinnými extrakty ponechány působení trávicích šťáv v procesu modelového trávení. U čistých kultur bez přidavku extraktu došlo vlivem trávení k usmrcení průměrně 99 % buněčné kultury. Následnou 24hodinovou kultivací se zvýšila životaschopnost živých buněk asi na 8 %. Přidavkem prebiotického extraktu do kultury došlo v některých případech k ochraně probiotických buněk. Největší ochranný efekt byl pozorován v kombinaci s kmenem *L. acidophilus*, kdy došlo k ochraně buněk přidavkem mladého ječmene nebo spiruliny. Viabilita po trávení činila asi 25 % a přidáním nových živin došlo ke zvýšení viability na 86–88 %. Ostatní extrakty s tímto kmenem nevykazovaly ochranný efekt. O něco nižší ochranný vliv měl mladý ječmen a spirulina v kombinaci s kmenem *B. breve*. U roztoků před trávením a po trávení byla sledována změna antioxidační aktivity v průběhu trávení. V procesu trávení došlo k výraznému poklesu antioxidační aktivity.

Modelové trávení bylo u kmene *B. breve* provedeno ještě s přidavkem reálných práškových vzorků. V tomto případě byla viabilita buněk po trávení nižší než v případě extraktu, jelikož aktivní látky nebyly extrahovány do vody a pro bakterie byly obtížněji využitelné.

V další části pro zvýšení stability byly směsi probiotik a prebiotik enkapsulovány do alginátových částic. Asi polovina částic byla následně ještě sušena mrazem na lyofilizátoru. Byly připraveny částice dvou velikostí, a to 450 μm a 1 000 μm . Enkapsulační účinnost vypočtená z rozdílu hladiny polyfenolů dosahovala pouze u tří typů částic vyšší hodnoty než 50 %. Nejvyšší enkapsulační účinnost (66,8 %) byla vypočtena u kombinace *L. acidophilus* s extraktem z moringy. Vyšší enkapsulační účinnost byla zde pravděpodobně zkreslena předchozím vysrážením enkapsulační směsi, kdy došlo k tvorbě sraženin v důsledku kontaktu extraktu moringy s alginátem. Nejnižší enkapsulační účinnost měly malé částice *L. acidophilus* s extraktem mladého ječmene, a to 28,7 %.

Enkapsulované částice byly poté podrobeny modelovému trávení, kde byla sledována jejich stabilita. U částic obsahujících kmen *Lactobacillus acidophilus* byly enkapsulované probiotické bakterie schopné v částicích přežít i v průběhu modelového trávení. U částic s přidavkem extraktu došlo ještě ke zvýšení počtu buněk (s výjimkou malých částic s ječmenem). Lyofilizované částice byly následně podrobeny modelovému trávení. Vlivem rehydratace došlo téměř u všech lyofilizovaných částic k nárůstu probiotické kultury. Na závěr byly také charakterizovány vybrané komerční probiotické preparáty.

Vhodnými částicemi pro aplikace do výrobků pro dětskou výživu by mohly být alginátové částice s přidavkem mladého ječmene. Tyto částice by mohly být v nelyofilizované formě přidávány do různých přesnídávek a příkrmů. Nejvhodnější formou částic pro malé děti by byly částice o velikosti 450 μm , které by s ohledem na malý rozměr nebyly ve stravě dítětem rozpoznány. Větší částice (1 000 μm) nejsou pro aplikaci do dětských výrobků vhodné. Tyto částice jsou příliš velké a v potravině snadno rozpoznatelné. Jejich velikost a velké množství by mohlo dělat dětem problémy v ústní dutině, čímž by děti mohly začít daný výrobek odmítat.

Po lyofilizaci jsou však alginátové částice mnohem menší a nemusela by tedy jejich konzumace dětem vadit. Lyofilizované částice je možné využít jako přídavek do umělé mléčné výživy a sušených kaší, které jsou dostupné v sušeném stavu ve formě prášku.

Alginátové částice s přídavkem extraktu z matchy nejsou vzhledem k vysokému obsahu kofeinu vhodné pro použití v dětské výživě. Tyto částice by bylo možné naopak využít pro aplikace do výrobků určených pro děti staršího školního věku.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] *Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation*. Rome: World Health Organization, 2006. ISBN 9251055130.
- [2] LEE, Yuan K. a Seppo SALMINEN. Handbook of probiotics and prebiotics. 2. vyd. Hoboken, N.J.: John Wiley, 2009. ISBN 978-047-0135-440
- [3] WILDMAN, Robert E. C. Handbook of nutraceuticals and functional foods. 2. vyd. Boca Raton: CRC Press, 2007. ISBN 978-0-8493-6409-9.
- [4] NEVORAL, Jiří. Prebiotika a probiotika v pediatrii. *Pediatric pro praxi* [online]. 2012, 13(3), 167-173 [cit. 2020-11-16]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/artkey/ped-201203-0007.php>
- [5] MARKOWIAK, Paulina, Katarzyna SLIZEWSKA. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* [online]. 2017, 9(9), 1021 [cit. 2020-11-25]. DOI: 10.3390/nu9091021. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu9091021>
- [6] LEE, Yuana K. a Seppo SALMINEN. The coming of age of probiotics. *Trends in Food Science and Technology* [online]. 1995, 6(7), 241-245. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224400890858>
- [7] SÝKORA, Josef, Jan SCHWARZ, Konrád SIALA. Probiotika a dětský věk. *Pediatric pro praxi* [online]. 2006, 5, 264-270 [cit. 2020-11-28]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2006/05/05.pdf>
- [8] ZBOŘIL, Vladimír, Lucie PROKOPOVÁ, Miluše HERTLOVÁ. Mikroflóra trávicího traktu: klinické souvislosti. Praha: Grada Publishing, 2005. 156 s. ISBN 80-247-0584-2.
- [9] *Bakterie mléčného kvašení, probiotika a fermentované mléčné výrobky*. 2.vyd. Praha: Potravinářská komora České republiky, Česká technologická platforma pro potraviny, 2019. ISBN 978-80-88019-37-4.
- [10] NEVORAL, Jiří. Výživa v dětském věku. Jinočany: H & H, 2003. ISBN 80-86022-93-5.
- [11] TURNBAUGH, Peter J., Ruth E. LEY, Micah HAMADY, Claire M. FRASER-LIGGETT, Rob KNIGHT a Jeffrey I. GORDON. The Human Microbiome Project. *Nature* [online]. 2007, 449, 804-810 [cit. 2020-11-25]. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nature06244>
- [12] BEZIRTZOGLU, Eugenia a Elisabeth STAVROPOULOU. Immunology and probiotic impact of the newborn and young children intestinal microflora. *Anaerobe* [online]. 2011, 17(6), 369-374 [cit. 2020-11-25]. DOI:10.1016/j.anaerobe.2011.03.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1075996411000345>

- [13] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. Mikrobiologie: pro potravináře a biotechnology. 2. vyd. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 8085605716.
- [14] LEFKOVITZ, Allen L., Barbara J. ZAROWITZ, Glenn R. GIBSON a Robert A. RASTALL. 2013. It's a microscopic world after all: Prebiotics, probiotics, and synbiotics. *Geriatric Nursing* [online]. 34(4): 323-325 [cit. 2020-11-25]. DOI: 10.1016/j.gerinurse.2013.06.007. ISSN 01974572. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0197457213002024>
- [15] DELAVENNE, Emilie, ISMAIL Rached, PAWTOWSKI Audrey, MOUNIER Jerome, BARBIER Georges, LE BLAY Gwenaelle. Assessment of lactobacilli strains as yogurt bioprotective cultures, *Food Control* [online]. 2013, 30(1), 206-213 [cit. 2020-11-25]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956713512003751>
- [16] SCHREZENMEIR, Jürgen a Michael de VRESE. Probiotics, prebiotics, and synbiotics – approaching a definition. *American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 2001, 73(2), 361S-364S [cit. 2020-12-09] Dostupné z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/73/2/361s/4737561>
- [17] ROBERFROID, Marcel. Prebiotics: The Concept Revisited. *The Journal of Nutrition* [online]. 2007, 137(3), 830S-837S [cit. 2020-12-09]. DOI: 10.1093/jn/137.3.830S. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jn/137.3.830S>
- [18] KOCHMAN, Joanna, Karolina JAKUBCZYK, Justyna ANTONIEWICZ, Honorata MRUK, a Katarzyna JANDA. Health Benefits and Chemical Composition of Matcha Green Tea: A Review. *Molecules* [online]. 2021, 26(1), 85. [cit. 2021-04-09]. DOI: 10.3390/molecules26010085. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26010085>
- [19] GAYLARD, Linda. *Čajové opojení*. Praha: Euromedia, 2017. Esence. ISBN 978-80-7549-282-1.
- [20] YUSUF, Nabiha, Cynthia IRBY, Santosh K. KATIYAR a Craig A. ELMETS. Photoprotective effects of green tea polyphenols. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* [online]. 2007, 23(1), 48-56 [cit. 2020-11-10]. DOI: 10.1111/j.1600-0781.2007.00262.x. ISSN 0905-4383. Dostupné z: <https://scihub.se/10.1111/j.1600-0781.2007.00262.x>
- [21] SIMONSOHN, Barbara. Moringa: zázračný jedlý strom: zlepší svoje zdraví a kvalitu svého života s nejhodnotnější rostlinou na světě. Praha: Kvalitní život.com, 2013. ISBN 978-80-260-8689-5.
- [22] LOMSKÝ, František. Superfoods na dlani: kniha o superpotravinách se super recepty. Praha: Cavalier Publishing, 2018. ISBN 978-80-270-4503-7.
- [23] ALAM, Pravej, Prawez ALAM, Mahmoud A. SHARAFELDIN, Mohammed H. ALQARNI. Simultaneous identification of rutin, chlorogenic acid and gallic acid in *Moringa oleifera* by densitometric high-performance thin-layer chromatography

- method. *JPC - Journal of Planar Chromatography – Modern TLC* [online]. 2020, 33(1), 27-32 [cit. 2020-11-21]. DOI: 10.1007/s00764-019-00002-2. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00764-019-00002-2>
- [24] KULKARNI, Sunil D., Jai. C. TILAK, R. ACHARYA, Nilima S. RAJURKAR, T. P. A. DEVASAGAYAM a A. V. R. REDDY. Evaluation of the antioxidant activity of wheatgrass (*Triticum aestivum L.*) as a function of growth under different conditions. *Phytotherapy Research* [online]. 2006, 20(3), 218-227 [cit. 2020-11-16]. DOI: 10.1002/ptr.1838. ISSN 0951-418X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/ptr.1838>
- [25] GHUMMAN, Atinder, Narpinder SINGH, Amritpal KAUR. Chemical, nutritional and phenolic composition of wheatgrass and pulse shoots. *International Journal of Food Science and Technology* [online]. 2017, 52(10), 2191-2200. [cit. 2020-11-16]. DOI: 10.1111/ijfs.13498. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/ijfs.13498>
- [26] DALLEN, Maria. Zelené potraviny: když jídlo je naším lékem: mladá pšenice, mladý ječmen, alfalfa, chlorela, spirulina, mořské řasy, zelenina. Praha: Ratio Bona, c2010, 113 s. ISBN 978-80-254-4590-7.
- [27] ZENG, Yawen, Xiaoying PU, Jiazhen YANG, et al. Preventive and Therapeutic Role of Functional Ingredients of Barley Grass for Chronic Diseases in Human Beings. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2018, 1-15 [cit. 2020-11-18]. DOI: 10.1155/2018/3232080. ISSN 1942-0900. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2018/3232080/>.
- [28] NEVORAL, Jiří a Magdalena PAULOVÁ. Výživa kojenců. 2. vyd. Praha: Státní zdravotní ústav, 2007. ISBN 978-80-7071-286-3.
- [29] BERKOVÁ, Kamila. Obecné zásady výživy dětí a dorostu. *Pediatric pro praxi*. 2002, 2002, 6, 301-302.
- [30] Legislativa pro výrobky pro děti do 3 let. Právní požadavky SZÚ [online]. Ing. Jitka Sosnovcová, 2008 [cit. 2020-12-05]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/bezpecnost-potravin/pravni-pozadavky>
- [31] STIBŮREK, Oldřich, Veronika PŘÍBRAMSKÁ, Jan LATA. Místo probiotik v léčbě (nejen) gastrointestinálních chorob. *Interní medicína pro praxi*. 2008, 2009, 11(1), 25-29.
- [32] Vyhláška č. 446/2004 Sb. ze dne 30. 7. 2004, kterou se stanoví požadavky na doplňky stravy a na obohacování potravin potravními doplňky. Sbírká zákonů, 2003, 149 [cit. 2020-12-01]. Dostupné z: <http://www.sagit.cz/info/sb0444>
- [33] ŠPELINA, Vladimír. Informace vědeckého výboru pro potraviny ve věci: Probiotika a startovací kultury. Brno: Státní zdravotní ústav 2006
- [34] RADA, Vojtěch. Využití probiotik, prebiotik a synbiotika. *Medicína pro praxi* [online]. 2011, 8(1), 25-29 [cit. 2020-12-16].

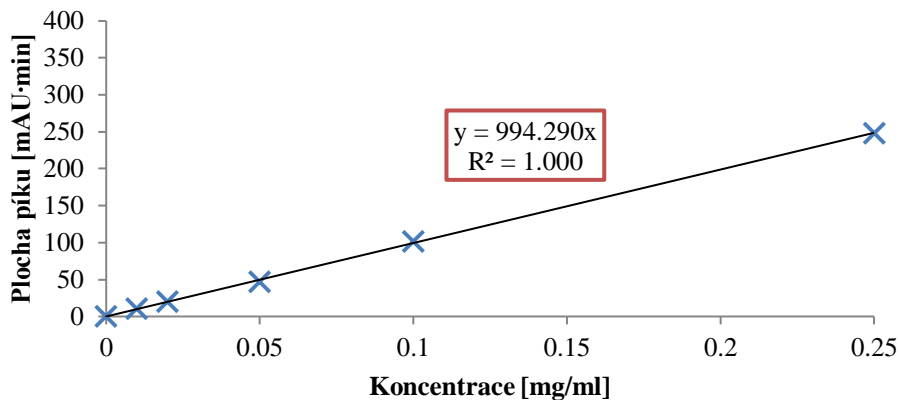
- [35] KECHAGIA, Maria, Dimitrios BASOULIS, Stavroula KONSTANTOPOULOU, Dimitra DIMITRIADI, Konstantina GYFTOPOULOU, Nikoletta SKARMOUTSOU a Eleni Maria FAKIRI. Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutrition* [online]. 2013, 2013, 1-7 [cit. 2020-12-03]. DOI: 10.5402/2013/481651.
- [36] LYE, Huey Shi, Kunasundari BALAKRISHNAN, Kokila THIAGARAJAH, Nor Ismaliza MOHD ISMAIL a Shao Yin OOI. Beneficial Properties of Probiotics. *Tropical Life Sciences Research* [online]. 2016, 27(2), 73-90 [cit. 2020-12-03]. DOI: 10.21315/tlsr2016.27.2.6. ISSN 19853718. Dostupné z: http://www.tlsr.usm.my/tlsr27022016/27022016_06.pdf
- [37] NEDOVIC, Viktor, Ana KALUSEVIC, Verica MANOJLOVIC, Steva LEVIC a Branko BUGARSKI. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science* [online]. Elsevier, 2011, 1, 1806-1815 [cit. 2020-12-02]. DOI: 10.1016/j.profoo.2011.09.265. ISSN 2211601X. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211601X11002665?via%3Dihub>
- [38] SARMENTO, Bruno, A. RIBEIRO, Francisco VEIGA, PaulaSAMPAIO, R. NEUFELD a Domingos FERREIRA. Alginate/Chitosan Nanoparticles are Effective for Oral Insulin Delivery. *Pharmaceutical Research* [online]. 2007-11-5, 24(12), 2198-2206 [cit. 2020-12-02]. DOI: 10.1007/s11095-007-9367-4. ISSN 0724-8741. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-007-9367-4>
- [39] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. Laboratorní techniky biochemie. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0586-2.
- [40] Československý lékopis: Pharmacopoea Bohemoslovaca. 4. vyd. Praha: Avicenum, 1987
- [41] Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1169/2011 ze dne 25. října 2011 o poskytování informací o potravinách spotřebitelům. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=celex%3A32011R1169>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

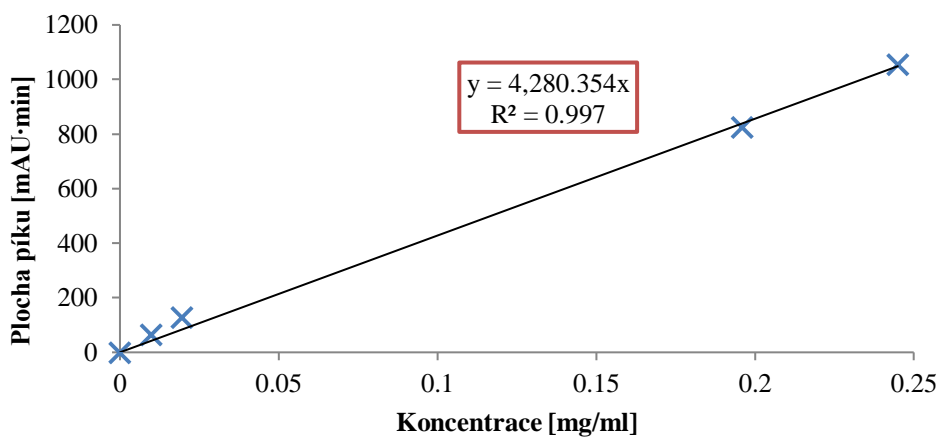
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt
BB	<i>Bifidobacterium breve</i>
CFU	Colony Forming Units (jednotky tvořící kolonie)
EU	Evropská unie
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
GIT	Gastrointestinální trakt
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LA	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
LC	<i>Lactobacillus casei</i>
MRS	Man-Rogosa-Sharp médiu/agar (specifická půda pro laktobacily)
WHO	Světová zdravotnická organizace

9 PŘÍLOHA

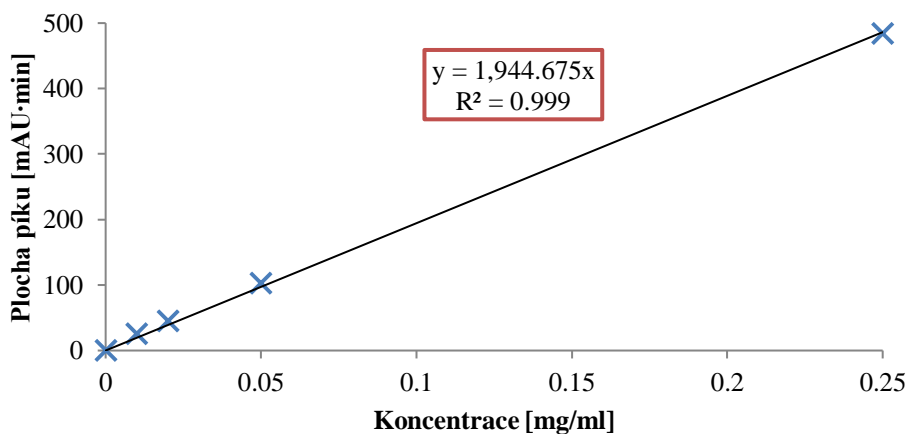
9.1 Příloha 1: Kalibrační křivky fenolických látek získaných z HPLC s UV-VIS detekcí



Obrázek 20: Kalibrační závislost epikatechinu

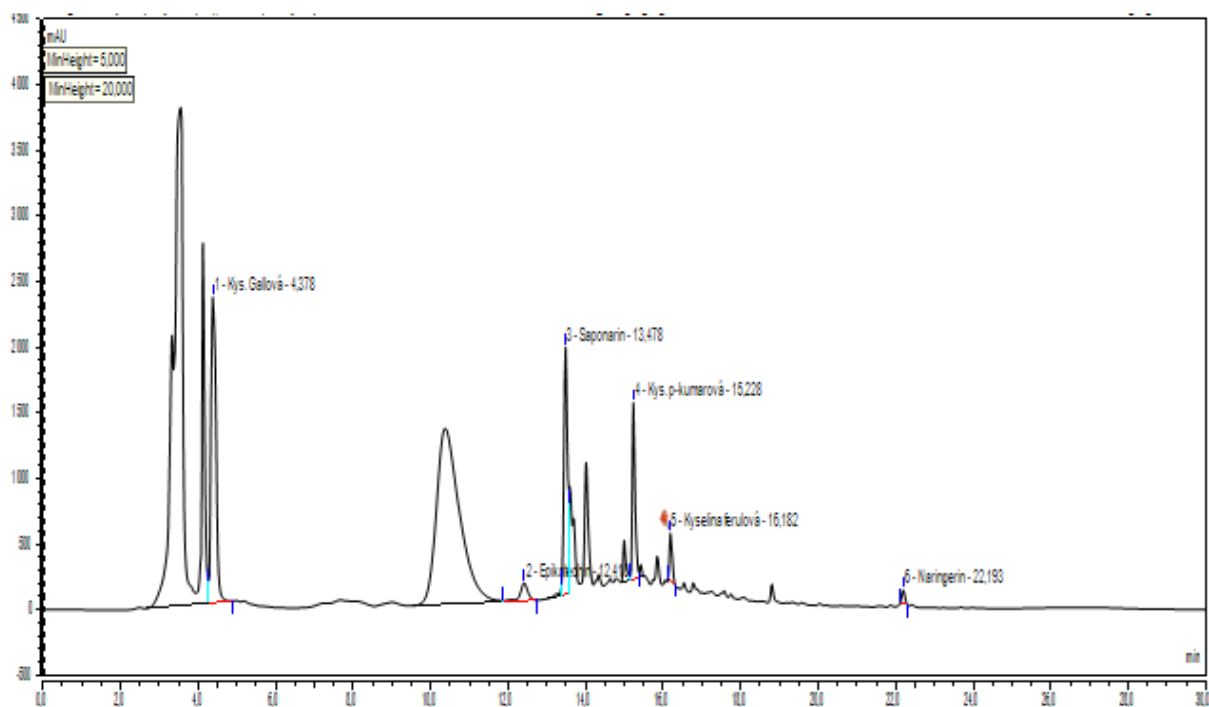


Obrázek 21: Kalibrační závislost kyseliny kávové



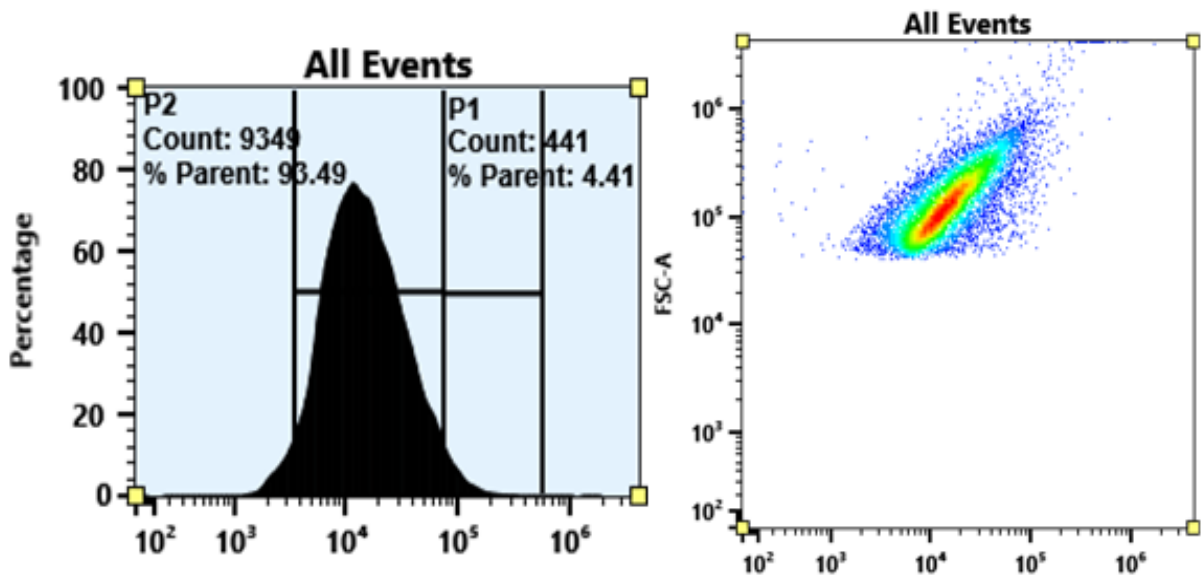
Obrázek 22: Kalibrační závislost kyseliny sinapové

9.2 Příloha 2: Chromatogram extraktu zeleného ječmene – stanovení fenolických látek pomocí HPLC s UV/VIS detekcí



Obrázek 23: Chromatogram fenolických látek v ethanolovém extraktu mladého ječmene

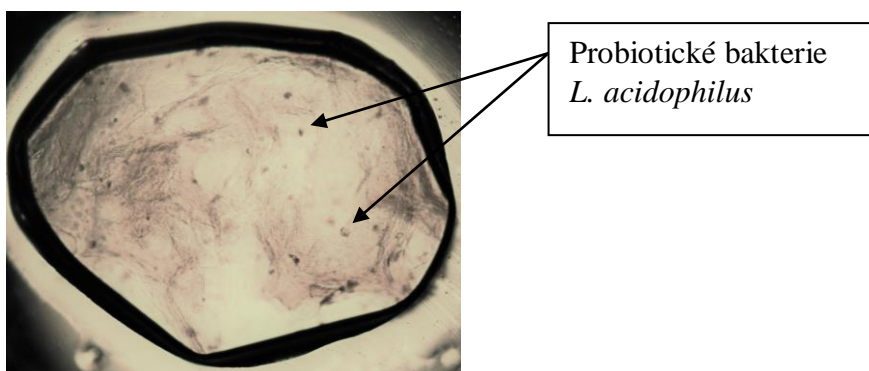
9.3 Příloha 3: Záznam z průtokového cytometru



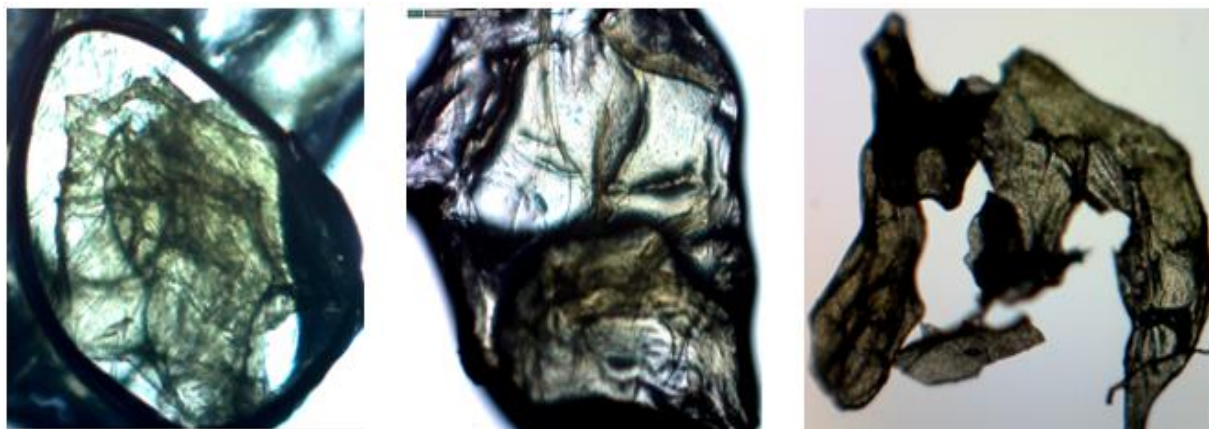
Obrázek 24: Příklad výstupu z průtokového cytometru pro čistou kulturu kmene *L. acidophilus-viabilita*

Na Obrázku 24 můžeme vidět záznam ze stanovení viability a množství buněk na průtokovém cytometru. Tento výstup zobrazuje živou bakteriální kulturu kmene *Lactobacillus acidophilus*. Barvení bakteriálních buněk bylo provedeno pomocí fluorescenčního barviva propidiumjodidu. Graf vlevo zobrazuje závislost procentuálního zastoupení buněk na intenzitě emise propidiumjodidu. Vpravo je naopak zobrazen graf závislosti počtu buněk (FSC) na intenzitě emise propidiumjodidu.

9.4 Příloha 4: Záznam alginátových částic z optického mikroskopu



Obrázek 25: Alginátová částice s enkapsulovanými buňkami *Lactobacillus acidophilus* (zvětšení 100x)



Obrázek 26: Alginátové částice s enkapsulovanými buňkami *Lactobacillus acidophilus* a extraktem z matchy. Zleva: Nelyofilizovaná částice, částice po trávení, lyofilizovaná částice (zvětšení 100x)